

MESTRADO EM CIÊNCIAS DO MAR - RECURSOS MARINHOS

ESPECIALIZAÇÃO EM AQUACULTURA E PESCAS

Avaliação multiparamétrica da aclimatação de juvenis de truta-fário (*Salmo trutta* f. *fario*) para estudos experimentais

Joana Luísa Costa

M

2016



Joana Luísa Ferreira Gomes Alves Costa

Avaliação multiparamétrica da aclimação de juvenis de truta-fário (*Salmo trutta* f. *fario*) para estudos experimentais

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Ciências do Mar - Recursos Marinhos - Especialização em Aquacultura e Pescas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Eduardo Jorge Sousa da Rocha

Categoria – Professor Catedrático

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Coorientadora –Tânia Vieira Madureira

Categoria – Professor Auxiliar Convidado e Bolseiro Post-Doc

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto.

Índice

Lista de figuras	v
Lista de tabelas	vi
Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Capítulo 1. Introdução	1
1.1. O conceito de bem-estar animal. Como pode ser avaliado?	1
1.1.1. Legislação relativa à implementação do bem-estar em animais de laboratório	3
1.1.2. Aplicação do conceito de bem-estar em peixes	3
1.2. Definir o <i>stress</i> - Resposta fisiológica em peixes	5
1.2.1. Avaliação do <i>stress</i> - Parâmetros bioquímicos e hematológicos	7
1.2.2. Avaliação do <i>stress</i> - Sistema imune e crescimento	10
1.2.3. Avaliação do <i>stress</i> - Análise comportamental	12
1.3. <i>Salmo trutta</i> (Linnaeus, 1758)	14
1.4. Objetivos	17
Capítulo 2. Material e métodos	19
2.1. Sistema de ensaio e animais	19
2.2. Desenho experimental	20
2.2.1. Parâmetros físico-químicos da água	21
2.2.2. Registo comportamental	22
2.2.3. Registo comportamental alimentar	24
2.3. Colheitas	26
2.4. Processamento histológico	28
2.5. Análise bioquímica do sangue e plasma	29
2.6. Análise da pele	29
2.6.1. Determinação qualitativa da cor da pele	29
2.6.2. Determinação quantitativa da área pigmentada em fragmentos de pele	29
2.6.3. Determinação quantitativa da área pigmentada em cortes histológicos de pele	30
2.7. Análise do rim anterior	32
2.7.1. Análise histo-morfológica do rim anterior	32
2.7.2. Determinação do cortisol por imuno-histoquímica	32
2.7.3. Determinação estereológica do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais	32
2.7.4. Quantificação dos níveis plasmáticos do cortisol por <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	33
2.8. Análise estatística dos dados	34
Capítulo 3. Resultados	37
3.1. Parâmetros físico-químicos da água	37

3.2. Registo comportamental.....	38
3.2.1. Localização.....	38
3.2.2. Movimentação	38
3.2.3. Posição vertical no tanque	39
3.2.4. Movimentação anormal	39
3.2.5. Coloração	39
3.3. Registo comportamental alimentar	41
3.3.1. Tempo em que o primeiro peixe reagiu ao alimento	41
3.3.2. Reação dos peixes ao alimento	42
3.3.3. Ração consumida.....	42
3.4. Parâmetros biométricos.....	44
3.5. Análise bioquímica do sangue e plasma	44
3.6. Análise da pele	45
3.6.1. Determinação qualitativa da cor da pele	45
3.6.2. Determinação quantitativa da área pigmentada em fragmentos de pele	46
3.6.3. Determinação quantitativa da área pigmentada em cortes histológicos de pele	46
3.7. Análise do rim anterior.....	47
3.7.1. Análise histo-morfológica do rim anterior.....	47
3.7.2. Determinação do cortisol por imuno-histoquímica	48
3.7.3. Determinação estereológica do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais	50
3.7.4. Quantificação dos níveis plasmáticos do cortisol por <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	50
3.8. Correlações e regressões lineares entre parâmetros.....	50
3.9. Registo da mortalidade	51
Capítulo 4. Discussão e conclusão	53
Referências	63
Anexos.....	69

Lista de figuras

Figura 1. Cascata hormonal que medeia as respostas primária e secundária ao <i>stress</i> em peixes, adaptado de Ross e Ross, 2008a.....	6
Figura 2. Sistema de ensaio.....	20
Figura 3. Esquema da distribuição dos tanques do sistema de ensaio	20
Figura 4. Folha de registo do comportamento dos peixes	22
Figura 5. Folha de registo do comportamento alimentar dos peixes.....	24
Figura 6. Esquema resumido do procedimento de amostragens.....	27
Figura 7. Esquema representativo do processamento histológico de rotina	28
Figura 8. Determinação quantitativa da área pigmentada nos fragmentos de pele	30
Figura 9. Determinação quantitativa da área pigmentada em imagens de cortes histológicos de pele	31
Figura 10. Determinação estereológica do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais.....	33
Figura 11. Parâmetros relativos ao registo comportamental ao longo dos 42 dias de ensaio.....	40
Figura 12. Parâmetros relativos ao registo comportamental alimentar ao longo dos 42 dias de ensaio.....	43
Figura 13. Parâmetros bioquímicos do sangue ou plasma ao longo dos 42 dias de ensaio	45
Figura 14. Análise qualitativa da coloração da pele de juvenis de truta-fário ao longo de 42 dias de ensaio.....	46
Figura 15. Percentagem de área pigmentada nos fragmentos de pele e nos cortes histológicos de pele de truta-fário ao longo de 42 dias de ensaio	47
Figura 16. Imagens histológicas de rim anterior de truta-fário (H&E e tricrómio de Masson).....	47
Figura 17. Determinação de cortisol por imuno-histoquímica, com aplicação de diferentes protocolos, em suprarrenal humana.....	48
Figura 18. Determinação de cortisol por imuno-histoquímica, com aplicação de diferentes protocolos, em rim anterior de truta-fário juvenil	49
Figura 19. Volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais e concentração plasmática de cortisol de truta-fário ao longo de 42 dias de ensaio.....	50

Lista de tabelas

Tabela 1. Listagem das condições essenciais para garantir o bem-estar animal (Huntingford e Kadri, 2008).....	1
Tabela 2. Parâmetros mais comuns de avaliação do bem-estar animal e a sua relação com os diferentes modelos conceituais (Huntingford e Kadri, 2008)	2
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água recomendados para peixes salmonídeos (MacIntyre <i>et al.</i> , 2008) e truta (Molony <i>et al.</i> , 2001).....	21
Tabela 4. Parâmetros físico-químicos da água de transporte dos animais	37
Tabela 5. Parâmetros físico-químicos (médias e desvios padrão) da água dos tanques ao longo do ensaio	37
Tabela 6. Percentagem de ocupação de cada um dos quadrantes em cada um dos tanques.....	38
Tabela 7. Tempo de reação ao alimento durante 5 minutos	43

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho só foi possível graças ao contributo de várias pessoas que, de forma direta ou indireta, me ajudaram nesta etapa tão importante, contribuindo para o meu desenvolvimento académico e pessoal. Estas palavras nunca serão suficientes para expressar o meu agradecimento.

Ao Professor Doutor Eduardo Rocha por ter aceitado ser meu orientador, e pelo seu empenho em perceber quais as áreas que me despertavam maior interesse em explorar e desenvolver, conciliando-as neste projeto. Obrigada por todo o entusiasmo e interesse que demonstrou na orientação deste trabalho, pela disponibilidade e partilha de conhecimentos, e ainda por me ter tirado da minha zona de conforto, acreditando nas minhas capacidades e fazendo-me ver que é sempre possível ir mais além.

À Professora Doutora Tânia Madureira pelo apoio e dedicação incondicionais ao longo de toda a coorientação, por todos os ensinamentos partilhados, disponibilidade e paciência que teve comigo. Obrigada por estar sempre atenta a todos os passos dados para que tudo corresse como planeado, e por me ter acalmado e ajudado nos momentos em que me senti perdida no meio de um desafio exigente e novo para mim, mostrando-me que tudo tem resolução.

Ao Professor Doutor José Fernando Gonçalves, pela ajuda dada no desenho do sistema de ensaio e pelo apoio na manutenção dos animais, sempre que necessário.

À Professora Doutora Lúcia Guilhermino por ter disponibilizado a utilização de equipamento do seu laboratório, permitindo realizar uma parte muito importante deste trabalho.

À Célia Lopes e à Fernanda Malhão por me terem recebido de braços abertos no laboratório, estando sempre disponíveis para ensinar, ajudar e aconselhar. Obrigada por tudo o que me ensinaram, pela paciência que tiveram e por todo o apoio que me deram nos bons e maus momentos. Entre muitas outras coisas, ensinaram-me uma muito importante: não ter medo de fazer perguntas! Todas as dúvidas são pertinentes por muito básicas que nos pareçam.

Ao Pedro Carvalho e ao Fernando Magalhães pela ajuda e partilha de conhecimentos na manutenção dos tanques, e por me terem acalmado quando, na fase inicial todos os desafios que surgiam pareciam ser gigantes.

À Luísa Silva, por ter partilhado artigos científicos relacionados com a temática desta Dissertação.

Aos meus pais, Glória e Luís, por permitirem que esta etapa fosse concretizável e por me apoiarem e ajudarem incondicionalmente ao longo de todo o meu percurso. Sem vocês eu nunca teria chegado até aqui.

À minha irmã, Sofia, pelo apoio que me deu e pela ajuda e compreensão na alteração das rotinas diárias que aconteceram muitas vezes.

Ao meu namorado, José Carlos, pela compreensão e pela paciência que teve para aturar o meu mau feitio, estando sempre ao meu lado nos maus e bons momentos, lembrando-me constantemente que tinha de acreditar em mim e nas minhas capacidades.

À Clara, por estar sempre disponível para ajudar e aconselhar, comprovando que a distância não minimiza a amizade, mas fortalece-a.

À Liliana, pelos muitos momentos que teve para me ouvir e por me fazer ver sempre o lado positivo das coisas.

À Cristina, pela ajuda na verificação ortográfica deste documento.

Sem suporte institucional este estudo não teria sido possível, pelo que se agradece o apoio financeiro do ICBAS – U.PORTO, através do seu Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos. O estudo também beneficiou do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), via programas europeus COMPETE e POPH, e fundos nacionais veiculados pela FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, através da bolsa pós-doutoramento [SFRH/BPD/97139/2013 (atribuída a Tânia V. Madureira)] e via projeto de financiamento estratégico UID/Multi/04423/2013, atribuído ao CIIMAR/CIMAR.

Resumo

Atualmente, a implementação do bem-estar animal está legislada e é obrigatória em animais de laboratório. Apesar disso, especificamente em peixes, é recorrente referir-se apenas o tempo de aclimação realizado, não estando claros o período de tempo e os métodos empregues para a verificação do bem-estar dos animais. Acresce o facto de que, antes do início dos estudos, os lotes experimentais de peixes são frequentemente adquiridos e transportados para o laboratório, o que provoca uma condição de *stress* prévia que altera o estado fisiológico e comportamental dos animais.

Neste contexto, o principal objetivo desta tese é estabelecer e parametrizar o tempo mínimo e ideal de aclimação de indivíduos juvenis de *Salmo trutta* f. *fario* (truta-fário), com aproximadamente 1 ano de idade, em condições laboratoriais (em biotério), após um episódio de *stress* agudo (transporte). A avaliação da resposta ao *stress* foi realizada através da monitorização dos animais durante 42 dias, com amostragens às 12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias. Para a análise multiparamétrica foram considerados parâmetros comportamentais, morfológicos, o perfil alimentar, a condição física e a bioquímica sanguínea/plasmática.

Na análise comportamental, verificou-se a ocupação de um menor número de quadrantes, a diminuição da movimentação dos animais e a cessação de movimentações anormais. A análise da posição vertical dos animais no tanque foi extremamente importante na verificação de comportamento hierárquico. Interligando estes dados verificou-se que a estabilização geral do comportamento ocorreu a partir do 17º dia pós-*stress*.

Quanto ao perfil alimentar, o tempo de reação ao alimento diminuiu, até ser instantâneo, e a reação dos peixes ao alimento alterou-se gradualmente ao longo do tempo em todos os tanques, pelo que no 1º dia não se observou reação dos peixes ao alimento e, a partir do 30º dia, a maioria dos peixes movimentou-se continuamente em busca de alimento. O consumo de ração não se verificou em nenhum tanque no 1º dia, tendo depois aumentado gradualmente. Avaliando estes parâmetros em conjunto concluiu-se que a estabilização geral do comportamento alimentar ocorreu a partir do 16º dia.

Os resultados biométricos obtidos não diferiram significativamente entre tempos, contudo demonstraram que apesar de inicialmente o consumo de ração ter diminuído, não foi suficiente para alterar o fator de condição dos animais.

Na análise da bioquímica do sangue observou-se que, no geral, os valores medianos de glucose foram relativamente estáveis ao longo do tempo do ensaio, tendo-se obtido uma correlação linear positiva o com fator de condição, assim como com a concentração

plasmática de cortisol. Tanto o colesterol como os triglicerídeos diminuíram ao 7º e 14º dia, comparativamente com as 12 horas, aumentando posteriormente, de forma gradual, até ao 42º dia. A correlação linear e positiva com o índice hepatossomático verificou-se em ambos os casos. Os valores medianos do hematócrito variaram entre 32 a 35%, estando próximos dos valores basais verificados nesta espécie. Os valores medianos de potássio não diferiram significativamente entre os diferentes tempos de colheita.

Os resultados das determinações quantitativas das áreas pigmentadas, em fragmentos de pele e em cortes histológicos de pele, evidenciaram uma tendência para a diminuição da percentagem de área pigmentada quantificada, com uma estabilização a partir do 14º dia. A percentagem da área pigmentada dos fragmentos de pele e as concentrações plasmáticas de cortisol apresentaram uma correlação linear positiva. Os níveis plasmáticos de cortisol não foram significativamente diferentes entre tempos, no entanto, a análise de regressão linear entre este parâmetro e o dia da colheita foi significativa e negativa. Através da comparação dos valores obtidos e dos níveis basais detetados na espécie, tudo indica que, no presente estudo, os animais começaram a apresentar níveis de *stress* menores entre o 14º e o 28º dia.

Os valores medianos do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais não foram significativamente distintos entre os diferentes tempos de colheita, mas a regressão linear entre este parâmetro e o dia da colheita foi significativa e negativa. Ao longo do tempo, verificou-se uma tendência geral para o seu decréscimo, com uma estabilização a partir do 14º dia.

A análise do tempo de recuperação de cada um dos parâmetros foi avaliado, concluindo-se que a estabilização geral dos animais ocorreu entre o 14º e o 28º dia, considerando-se que a partir do 28º dia os animais estão aclimatados, recomendando-se por isso um período de aclimação de no mínimo 28 dias, de forma a garantir os níveis basais em repouso para a espécie.

Em trabalhos futuros, em que se pretenda monitorizar de forma sistemática o processo de aclimação antes de um ensaio laboratorial, sugere-se a implementação dos seguintes parâmetros: comportamentais (localização dos animais no tanque, movimentação dos peixes, posição vertical dos peixes no tanque e existência de movimentações anormais), perfil alimentar (análise do tempo em que o primeiro peixe reagiu ao alimento, reação dos animais ao alimento e quantidade de ração consumida), condição física (fator de condição) e bioquímica sanguínea (colesterol, triglicerídeos e glucose), assim como a avaliação quantitativa das áreas pigmentadas dos fragmentos de pele, a análise estereológica do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais e a quantificação dos níveis plasmáticos do cortisol.

Abstract

Currently, the implementation of animal welfare is legislated and is required for laboratory animals. Despite this, specifically in fish, it is commonly referred only the acclimation time performed, not being clear the period and the methods employed for checking the welfare of animals. Moreover the fact that, before the start of the studies, the experimental batches of fish are often purchased and transported to the laboratory, leads to a pre-stressed condition that alters the physiological and behavioral state of the animals.

In this context, the main objective of this thesis is to establish and parameterize the minimum and ideal time for acclimation of juvenile individuals of *Salmo trutta* f. *fario* (brown trout), with approximately 1 year old, in laboratory conditions (in bioterium), after an episode of acute stress (transport). The evaluation of the stress response was performed by monitoring the animals during 42 days with sampling at 12 hours, 7, 14, 28 and 42 days. For the multi-parameter analysis there were considered behavioral and morphological parameters, the nutritional profile, the physical conditions and blood/plasma biochemistry.

In the behavioral analysis, it was found an occupation of a smaller number of quadrants, the decrease of animal movement and the absence of abnormal movements. The analysis of the vertical position of the animals in the tank was very important for the hierarchical behavior evaluation. Interconnecting these data it was found that the general behavior stabilization occurred at the 17th day post-stress.

As for the food profile, the reaction time to the food decreased until it was instantaneous, and the reaction of the fish to the food gradually changed over time in all the tanks, so that on the 1st day there was no reaction of the fish to the food and, from the 30th day, most of the fish moved continuously in search of food. Feed intake did not occur in any tank on day 1, and then increased gradually. Evaluating these parameters together it was concluded that the general stabilization of the feeding behavior occurred from the 16th day.

The biometric results did not differ significantly between times, however they showed that although initially feed intake decreased, it was not sufficient to change the condition factor.

From the biochemical analysis of the blood it was observed that, in general, the median glucose values showed a relative stability along the assay, and a positive linear correlation was observed with the condition factor, as well as with the plasma cortisol concentration. Both cholesterol and triglycerides decreased at the 7th and 14th days, compared to 12 hours, then they increased, gradually until the 42nd day. The positive

linear correlation with the hepatosomatic index was found in both cases. The median values of hematocrit ranged from 32 to 35%, being close to the baseline values recorded in this species. Median potassium values did not differ significantly between the different times.

The results of the quantitative determination of the pigmented areas on the fragments and histological sections of the skin, showed a tendency to decrease the percentage of pigmented area, with stabilization from the 14th day. The percentage of the pigmented area of skin fragments and plasma cortisol levels showed a positive linear correlation. Plasma cortisol levels were not significantly different at distinct times; however, the linear regression between this parameter and the sampling day was significant and negative. By comparing the values obtained and the baseline levels reported for this species, it seems that in this study, the animals began to have lower stress levels between 14th and 28th day.

The volume-weighted nuclear volume of interrenal cells was not significantly distinct between the different sampling days, but the linear regression analysis between this parameter and the sampling day was significant and negative. Over time, there was a general trend for its decrease with stabilization from the 14th day.

The time of recovery of each parameter was evaluated, concluding that overall the stabilization of the animal's occurred between the 14 and 28 days, considering that from the 28th day they are acclimated, we recommend an acclimatization period of at least 28 days, in order to ensure the baseline levels of this species.

In future studies, in which it is intended to monitor systematically the acclimatization process before a laboratory assay, it is suggested the implementation of the following parameters: behavioral (animal location in the tank, fish movement, vertical position of the fish in the tank and existence of abnormal movements), food profile (time that the first fish react to food, animal reaction to food and the amount of consumed food), physical condition (condition factor) and blood biochemistry (cholesterol, triglycerides and glucose), as well as, the quantification of the pigmented areas of skin fragments, stereological analysis of the volume-weighted nuclear volume of interrenal cells and quantitation of plasma cortisol levels.

Capítulo 1. Introdução

1.1. O conceito de bem-estar animal. Como pode ser avaliado?

O conceito de bem-estar é complexo e difícil de definir globalmente, uma vez que implica a junção de diferentes dimensões: científica, ética/cultural, económica e política (Huntingford e Kadri, 2008; Carenzi e Verga, 2009). Idealmente o termo "bem-estar" deveria refletir um conceito claro, podendo ser cientificamente avaliado, e utilizado pela comunidade. Contudo, isto não se verifica, devido à existência de diferentes atitudes em relação aos animais (empresários, consumidores, veterinários, políticos, entre outros), pelo que existem diferentes metodologias utilizadas na avaliação do bem-estar (Carenzi e Verga, 2009).

De uma forma geral, a maioria das definições científicas existentes referem que o bem-estar de um animal está garantido, quando pelo menos uma das três condições indicadas na Tabela 1 está assegurada. As condições descritas sustentam-se nos pressupostos e nas implicações de diferentes modelos conceituais de bem-estar baseados no funcionamento biológico, na natureza e no funcionamento mental do animal (Huntingford e Kadri, 2008; Carenzi e Verga, 2009; Hemsworth *et al.*, 2015).

Tabela 1. Listagem das condições essenciais para garantir o bem-estar animal (Huntingford e Kadri, 2008).

Condições	Base dos modelos conceituais
O animal está adaptado ao meio ambiente onde está inserido, verificando-se um bom estado de saúde e o funcionamento adequado de todos os seus sistemas biológicos.	Funcionamento Biológico
O animal tem uma vida igual à que teria no ambiente natural e expressa o mesmo tipo de comportamentos que expressaria na natureza, sendo possível identificar as suas necessidades comportamentais.	Natureza
O animal não é sujeito a experiências negativas (exemplo: dor, medo e fome) e tem acesso a experiências positivas (exemplo: companheirismo social).	Funcionamento mental

Na Tabela 2, encontram-se resumidos os parâmetros utilizados com maior frequência na medição do bem-estar, estando indicada a sua relação com cada uma das definições apresentadas na Tabela 1.

Tabela 2. Parâmetros mais comuns de avaliação do bem-estar animal e a sua relação com os diferentes modelos conceituais (Huntingford e Kadri, 2008).

Medidas de bem-estar/parâmetros		Modelos conceituais		
		Funcionamento biológico	Natureza	Funcionamento mental
Condição física	Lesões e doenças	X		
	Sistema imunológico	X		
	Condição nutricional	X		
	Crescimento	X	X	
	Reprodução	X	X	
Estado fisiológico	Estado metabólico	X	X	
	Hormonas	X	X	
	Bioquímica cerebral	X	X	X
	Genes <i>on/off</i>	X	X	
Estado comportamental	Sinais de <i>stress</i> /medo	X	X	X
	Estereótipos		X	X
	Reportório natural		X	X

Na tentativa de facilitar a distinção entre mal-estar e bem-estar animal, a *Farm Animal Welfare Committee* (FAWC) sugeriu uma abordagem, composta por cinco parâmetros (ausência de fome e sede; ausência de desconforto; ausência de dor, lesões ou doenças; liberdade para expressarem o seu comportamento normal e ausência de medo e angústia) que quando se verificam indicam a implementação do bem-estar nos animais (FAWC, 2009).

Os componentes biológicos, físicos e psicológicos, envolvidos na determinação do nível de bem-estar, têm de ser estudados e interligados entre si, sendo para isso necessário validar medidas fisiológicas, imunológicas e comportamentais, o que implica uma compreensão adequada dos seus mecanismos biológicos (Carenzi e Verga, 2009). Este conhecimento permitirá estabelecer modelos de avaliação global do bem-estar. Neste contexto, Pettersen e colaboradores (2014) desenvolveram o modelo SWIM 2.0 que permite o cálculo do índice de bem-estar em salmão (*Salmo salar* L.). Esta avaliação formal e padronizada do bem-estar teve por base uma seleção de indicadores de bem-estar, práticos e mensuráveis, descritos na literatura, podendo ser aplicado na prática.

1.1.1. Legislação relativa à implementação do bem-estar em animais de laboratório

Atualmente já existe legislação que estabelece uma implementação do bem-estar para animais utilizados em experimentação científica. A Direção Geral de Alimentação e Veterinária é a entidade responsável pelo licenciamento prévio de projetos ou qualquer atividade que envolva a utilização de animais vertebrados. Este licenciamento é obrigatório e tem como base a legislação vigente em Portugal de acordo com o Decreto - Lei 113/2013 (DR, 2013), que transpõe a Diretiva n.º 2010/63/UE relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos (UE, 2010).

As normas mínimas relativas à proteção dos animais utilizados para fins científicos ou educativos, dos quais fazem parte os animais utilizados em experimentação, são estipuladas neste decreto-lei que obriga à aplicação dos cuidados adequados, ausência de dor, sofrimento, aflição ou dano permanente, quando desnecessário. A legislação vigente tem ainda em conta a política dos 3R's baseada nos conceitos de substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*). De forma simplificada, esta normativa dos 3R's garante que, sempre que possível, a utilização dos animais seja substituída por métodos alternativos adequados à experiência, assim como a existência duma substituição dos animais por organismos considerados filogeneticamente inferiores. Complementarmente, exige ainda que haja uma redução do número de animais utilizados através da aplicação de métodos matemáticos que permitam um cálculo correto do número de animais necessários, para se obterem resultados fidedignos e que não comprometam o estudo. O refinamento diz respeito às técnicas e procedimentos de criação e manutenção no alojamento e nos cuidados prestados aos animais, de modo a reduzir o impacto negativo que possam acarretar.

1.1.2. Aplicação do conceito de bem-estar em peixes

De um modo geral, os sistemas fisiológicos e comportamentais que medeiam a dor e o *stress* nos peixes são comparáveis aos de outros vertebrados; no entanto, existem diferenças a ter em consideração de forma a compreender especificamente o conceito de bem-estar em peixes. Uma diferença óbvia é o facto de os peixes estarem perfeitamente adaptados para viverem no meio aquático, estando, portanto, intimamente relacionados com o meio que os rodeia. Assim sendo, a qualidade da água é o aspeto mais importante do seu meio ambiente. Adicionalmente, os peixes são animais ectotérmicos, o que em termos alimentares poderá corresponder a períodos de privação de alimento,

especialmente a baixas temperaturas, não estando essa situação associada à existência de mal-estar, ao contrário do que acontece com outros animais, nomeadamente os endotérmicos. Outro aspeto diferenciador em peixes é o facto de não ser possível avaliar sinais faciais e vocais que funcionam como indicadores da perceção de sensações de medo e angústia noutros vertebrados (Huntingford e Kadri, 2008).

A avaliação da senciência (consciência de sensações e sentimentos) é realizada através de, pelo menos, três fatores: nociceção, capacidades cognitivas e *stress* psicogénico. Quando se verifica a existência de um sistema nociceptivo que permite que o indivíduo tenha uma noção consciente da dor; uma elevada complexidade cognitiva, indicativa da existência da capacidade de produção de representações elaboradas e a ocorrência de *stress* psicogénico, proveniente da ativação cognitiva da resposta aos agentes de *stress*, verifica-se a existência de senciência (Oliveira e Galhardo, 2007). Os mesmos autores, através da análise de dados existentes sobre estes três fatores em peixes concluíram que estes indicam, de forma consistente, a existência de senciência nestes animais, validando a aplicação do conceito de bem-estar em peixes teleosteos, e realçando a importância do seu estudo no que diz respeito à influência que as atividades humanas possam implicar.

Existem outros autores a confirmarem este facto, sugerindo que há evidências anatómicas, fisiológicas e comportamentais, que mostram uma clara existência de nociceção nos peixes, o que demonstra a sua capacidade de sofrer, tanto através da indução de dor como pelo medo (Wolffrom, 2004; Ashley, 2007).

Como já foi referido, a aplicação do conceito bem-estar está resumida em cinco parâmetros estabelecidos pela FAWC (FAWC, 2009), havendo já um referencial indicativo dos procedimentos a realizar em peixes, como sendo (Wolffrom, 2004): uma dieta adequada e nutricionalmente completa, tendo em conta a espécie em questão, os seus requisitos e a idade dos animais; parâmetros adequados relativos à qualidade da água, fluxos e taxas de temperatura, intensidade de luz e outros fatores necessários; a aplicação de procedimentos e cuidados que evitem lesões e previnam infeções e doenças, de forma a garantir boas condições sanitárias, vacinação e evitar o surgimento de malformações; disponibilização de condições que permitam que os animais tenham liberdade para expressar o seu comportamento normal, proporcionando instalações adequadas e companhia de animais da mesma espécie; a prática de procedimentos de manuseamento suaves e adequados e procedimentos de atordoamento antes da eutanásia, que insensibilizem os animais de imediato.

1.2. Definir o *stress* - Resposta fisiológica em peixes

O *stress* pode ser definido como um conjunto de respostas não específicas do organismo perante situações que podem desequilibrar a sua homeostasia. O episódio de *stress* pode ser de natureza física (manuseamento, transporte e confinamento dos animais), química (contaminantes, baixos teores de oxigénio e pH), e ainda causado por eventuais acontecimentos percebidos pelos animais (existência de predadores e coespecíficos não familiares) (Oliveira e Galhardo, 2007; Rocha, 2011).

No geral, a resposta ao *stress* é caracterizada por um conjunto de acontecimentos neuroendócrinos ativados pela perceção de uma ameaça (Pottinger, 2008). Em função da severidade e do contexto do agente causador do *stress*, o mecanismo de resposta pode tornar-se disfuncional, afetando de forma negativa a fisiologia e o comportamento do animal (Pottinger, 2008; Rocha, 2011). Um episódio de *stress* pode ser de curta ou longa duração, e com intensidades distintas, o que se traduzirá em repercussões diferentes nos animais, que estão inteiramente relacionadas com a espécie, estirpes ou lotes considerados, assim como, com a origem dos animais (reprodução no habitat natural ou em laboratório) (Obernier e Baldwin, 2006; Oliveira e Galhardo, 2007; Rocha, 2011). Assim, a existência de *stress* interfere no bem-estar dos animais, o que pode ser contraproducente tanto em laboratório como em aquacultura, podendo culminar em morte, ou por exemplo, na diminuição do consumo alimentar, que por sua vez poderá causar um atraso no crescimento (Ross e Ross, 2008a).

A resposta generalizada ao *stress* é caracterizada por uma fase de resposta inicial seguida de um período de tentativa de resistência ou adaptação ao agente causador de *stress* (Ross e Ross, 2008a). A resposta fisiológica caracteriza-se por uma resposta primária, secundária e terciária. A resposta primária é mediada por ações motoras e pela libertação de hormonas na corrente sanguínea, como resultado da estimulação neuroendócrina. Nos peixes, as ações hormonais são mediadas através do sistema adrenérgico e o eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) (Figura 1) (Ross e Ross, 2008a).

O primeiro mecanismo de resposta é a rápida ativação do sistema nervoso simpático, que estimula o tecido cromafim, localizado na porção anterior do rim, a produzir catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), que são diretamente libertadas para a corrente sanguínea (Pottinger, 2008; Ross e Ross, 2008a). Em simultâneo, mas de forma mais lenta, ocorre uma cascata de reações endócrinas, que envolve o hipotálamo, a pituitária e o tecido interrenal (Pottinger, 2008). O hipotálamo liberta hormonas que ativam a produção e libertação de hormonas corticotrópicas na glândula pituitária, como a hormona adrenocorticotrófica (ACTH), que por sua vez atua no tecido interrenal (rim

anterior), promovendo a síntese e libertação de hormonas esteroides para a corrente sanguínea, como o cortisol no caso dos peixes teleósteos (Pottinger, 2008; Ross e Ross, 2008a). Geralmente, o aumento e a duração dos níveis plasmáticos do cortisol são proporcionais à gravidade e à duração da exposição ao agente causador de *stress*. Contudo, em casos de exposição repetida, a elevação do cortisol pode deixar de se verificar, mesmo que inicialmente os níveis de resposta tenham sido elevados (FSBI, 2002).

Relativamente à resposta secundária a um agente causador de *stress*, esta engloba os efeitos metabólicos (bioquímicos e fisiológicos) provocados pelas hormonas libertadas na resposta primária (Sampaio e Freire, 2016). Dependendo da hormona em questão, o tempo decorrente até à verificação das suas ações e o tempo durante o qual estes se verificam vão ser diferentes, como indicado na Figura 1 (Ross e Ross, 2008a).

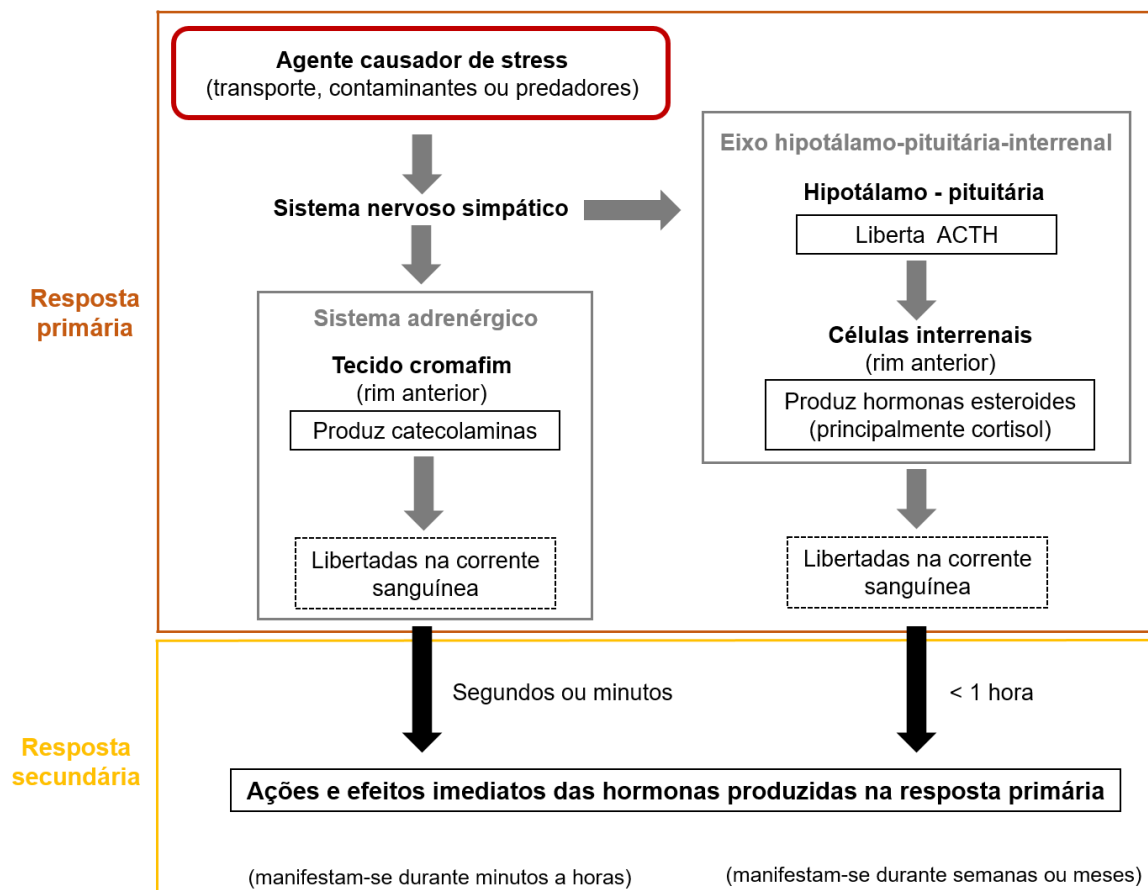


Figura 1. Cascata hormonal que medeia as respostas primária e secundária ao *stress* em peixes, adaptado de Ross e Ross, 2008a.

Finalmente, a resposta terciária ocorre quando o animal é exposto a fatores de *stress* de forma intermitente, ou continuamente por períodos de tempo prolongados, originando uma resposta de *stress* crónica. Isto faz com que o animal não consiga adaptar-se ao

fator de *stress*, verificando-se uma inibição do crescimento, disfunção reprodutiva e perda da imunocompetência, tornando-o mais suscetível a agentes patogénicos e parasitas (Pottinger, 2008).

1.2.1. Avaliação do *stress* - Parâmetros bioquímicos e hematológicos

As alterações hormonais verificadas na resposta primária caracterizam-se pelo aumento dos níveis de corticosteroides (principalmente cortisol em peixes teleósteos) e das catecolaminas (principalmente epinefrina) (Ross e Ross, 2008a; Sampaio e Freire, 2016). No entanto, a resposta por parte da adrenalina é muito rápida e verifica-se por períodos curtos (Ross e Ross, 2008a), existindo assim uma preferência na escolha do cortisol plasmático como biomarcador de referência para a resposta neuroendócrina (Sampaio e Freire, 2016), sendo o indicador mais utilizado para avaliar a ativação do eixo HPI (Pottinger, 2008). No entanto, a utilização isolada do cortisol, como medida de *stress* não deve ser efetuada, uma vez que valores baixos podem indicar exaustão da capacidade de secreção do tecido interrenal, e valores elevados, verificados num curto espaço de tempo, podem acontecer devido a uma preparação do organismo para realizar atividade física, verificando-se, por exemplo, antes da alimentação (FSBI, 2002).

Sampaio e Freire (2016) verificaram que em diferentes espécies de peixes, após um episódio de transporte de curta duração (< 8 horas), os níveis plasmáticos de cortisol aumentaram acentuadamente, em comparação aos valores verificados antes do transporte. Estudos realizados em diferentes espécies de salmonídeos (*Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis*) utilizaram este parâmetro na análise de diferentes tipos de *stress* (manipulação, confinamento, transporte, densidades de manutenção) tendo-se verificado em todos o aumento da concentração de cortisol pós-*stress*, e a sua diminuição com o decorrer do tempo. Com base na literatura verifica-se que os valores máximos de cortisol detetados e o tempo decorrente até esses valores serem atingidos variam com o tipo de *stress* induzido e a espécie em questão (Pickering *et al.*, 1982; Barton, 2000; Yarahmadi *et al.*, 2015; Sampaio e Freire, 2016; Shabani *et al.*, 2016). Na maioria dos trabalhos referidos, o tempo de duração do ensaio não permitiu avaliar a retoma aos valores de repouso, no entanto, em trutas-fário sujeitas a manuseamento e condicionamento, verificou-se que os valores de cortisol são iguais ou mais baixos do que o grupo controlo a partir das 4 horas pós-*stress* (Pickering *et al.*, 1982).

Segundo Iwama (1998), em salmonídeos, os valores de cortisol em repouso são inferiores a 10 ng/mL, e em *stress* encontram-se entre 40-200 ng/mL. Pickering e Pottinger (1989) verificaram níveis basais de cortisol plasmático em trutas-fário (1 ano)

inferiores a 5 ng/mL e no estudo realizado por Barton (2000), em trutas-fário juvenis, os níveis de repouso verificados foram aproximadamente de 1 ng/mL. No entanto, o grupo controlo utilizado no estudo de Pickering (1982), composto por animais adultos (2 anos), às 0 horas a concentração de cortisol foi de 30 ng/mL de cortisol, tendo este valor oscilado aproximadamente entre as 30 e os 70 ng/mL até ao final do estudo (28 dias).

As catecolaminas são indicadas como indutoras da glicogenólise (Eslamloo *et al.*, 2014), tal como o cortisol, que também promove a gluconeogénese, o que permite manter o fornecimento de oxigénio e de energia necessários para a regulação osmótica, verificando-se assim um aumento da glucose sanguínea e a diminuição do glicogénio (no fígado e no músculo), contudo esta alteração metabólica nem sempre é linear (Sampaio e Freire, 2016). No entanto, estes autores consideram que a glucose é um bom indicador de *stress* em peixes quando estes são transportados num período inferior a 8 horas. Níveis mais elevados de glucose no sangue a baixas temperaturas indicam um metabolismo retardado dos hidratos de carbono, sendo também um índice de tensão subletal. A diminuição da sua concentração sérica pode resultar da subnutrição ou de um controlo hormonal alterado (Ahmad *et al.*, 2011).

Existem vários trabalhos, em diferentes espécies, que incluem este parâmetro na análise do *stress*, sendo este provocado por diferentes fatores (Pickering *et al.*, 1982; Barton, 2000; Ahmad *et al.*, 2011; Yarahmadi *et al.*, 2015; Sampaio e Freire, 2016). Verifica-se, tal como no caso do cortisol, que os valores de glucose aumentam, regra geral, após um episódio de *stress*, e que os valores máximos detetados e o tempo decorrente até se verificarem estes valores também variam com o tipo de *stress* induzido e a espécie em questão. Em trutas-fário sujeitas a manuseamento e confinamento observou-se a existência de valores de glucose significativamente mais elevados, às 2 e 4 horas pós *stress* (aproximadamente 110 mg/100 mL e 140 mg/100 mL, respetivamente), comparativamente com o grupo controlo (aproximadamente 75 mg/100 mL e 85 mg/100 mL). De referir que após 30 horas do episódio de *stress* o grupo manipulado apresentava valores significativamente menores (aproximadamente 80 mg/100 mL) comparativamente ao grupo controlo (aproximadamente 125 mg/100mL). Às 0 horas os dois grupos (controlo e manipulado) não apresentavam diferenças significativas nos valores de glucose (80 mg/100 mL e 110 mg/100 mL, respetivamente). A estabilização dos valores ocorreu às 72 horas, tendo variado aproximadamente entre os 95 a 110 mg/100 mL até aos 28 dias pós-*stress* (Pickering *et al.*, 1982). Em carpas comuns (*Cyprinus carpio communis*) aclimatadas a diferentes temperaturas, especificamente a 20 °C (controlo), 24, 28 e 32 °C, verificou-se o aumento da glucose entre os 20 °C e os 28 °C (84,73 mg/dL e 97,66 mg/dL respetivamente), tendo-se obtido

valores inferiores ao controlo quando os animais foram aclimatados a 32 °C (59,66 mg/dL) (Ahmad *et al.*, 2011).

O lactato é produzido pelo metabolismo anaeróbico nos músculos brancos de peixes teleósteos, quando se verificam condições de hipóxia ou exercício extenuante (Pickering *et al.*, 1982). Em trutas-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) sujeitas a transporte, os valores de lactato sanguíneo aumentaram para 3,1 mmol/L, comparativamente aos valores de repouso (0,8 mmol/L). Nas 48 horas após o transporte os valores reduziram significativamente, atingindo os valores em repouso (Shabani *et al.*, 2016). Em trutas-fário sujeitas a manuseamento e confinamento (2 minutos), a concentração plasmática de lactato atingiu um pico 2 horas após o *stress* (55 mg/100 mL), diferindo significativamente do grupo controlo (10 mg/100 mL). Entre as 8 horas e os 28 dias os valores médios de lactato estabilizaram, variando aproximadamente entre 10 a 15 mg/100 mL. Os valores do grupo controlo foram sempre inferiores a 20 mg/100 mL (Pickering *et al.*, 1982).

Nos peixes, o colesterol tem funções estruturais, funcionais e metabólicas, sendo que a nível estrutural desempenha um papel importante, sendo um componente estrutural das membranas celulares, diminuindo a fluidez e a permeabilidade da membrana plasmática a proteínas e iões. Na glândula interrenal e na gónada atua como precursor de esteroides (Tocher e Glencross, 2015). O aumento do colesterol e dos triglicerídeos indica distúrbios do metabolismo dos lípidos e das lipoproteínas, e ainda doenças hepáticas (Ahmad *et al.*, 2011).

Os valores de colesterol e triglicerídeos plasmáticos foram significativamente diferentes em trutas-arco-íris sujeitas a alta e baixa densidade de manutenção, tendo-se verificado valores inferiores nos animais sujeitos a alta densidade (117,22 mg/dL e 204,02 mg/dL, respetivamente) comparativamente aos animais sujeitos a baixa densidade (157,25 mg/dL e 274,65 mg/dL, respetivamente) (Yarahmadi *et al.*, 2015). Em carpas comuns os valores médios destes dois parâmetros aumentaram com a subida da temperatura. Aos 20 °C (controlo) os valores médios de colesterol e triglicerídeos foram de 142,87 mg/dL e 108,50 mg/dL, e na temperatura máxima testada (32 °C) de 194,50 mg/dL e 149,67 mg/dL, respetivamente (Ahmad *et al.*, 2011).

Relativamente à osmolaridade, Sampaio e Freire (2016) verificaram que apesar de ser o parâmetro que melhor reflete a definição de homeostasia, raramente é implementado na avaliação do *stress* no transporte dos peixes. Em trutas-arco-íris sujeitas a transporte (3 horas e 20 minutos), em condições de hiperóxia, os valores plasmáticos de sódio, cloro e potássio não diferiram significativamente, comparativamente com os valores verificados antes do transporte. No entanto, consideram que após 48 horas os animais ainda apresentavam um distúrbio no equilíbrio iónico, uma vez que os valores de sódio eram significativamente mais elevados 24 e 48 horas pós-stress, relativamente aos valores

verificados antes e logo após o transporte dos animais, e que os valores de cloro eram mais elevados 24 e 48 horas após o transporte relativamente ao valor antes do transporte (Shabani *et al.*, 2016). A falência osmorregulatória tem sido frequentemente demonstrada como um importante contribuinte na morte de peixes (Ahmad *et al.*, 2011).

Os marcadores hematológicos mais utilizados para avaliação da condição de *stress* em peixes são o hematócrito, a hemoglobina e a contagem de eritrócitos, no entanto, é frequente não apresentarem alterações, mesmo quando os valores de cortisol indicam a ativação da resposta ao *stress* (Sampaio e Freire, 2016). O aumento da hemoglobina e do hematócrito demonstra um aumento da capacidade de transporte de oxigénio no sangue, permitindo o fornecimento necessário aos órgãos principais, em resposta a uma maior exigência metabólica provocada pelo *stress*.

1.2.2. Avaliação do *stress* - Sistema imune e crescimento

O muco e a pele dos peixes atuam como uma barreira defensiva natural a substâncias estranhas e agentes patogénicos. O muco desempenha um mecanismo de defesa não-específico, através da sua produção nas brânquias, pele ou revestimento do intestino, impedindo a colonização dos agentes patogénicos nos peixes (Shoemaker *et al.*, 2015). Comparando trutas-fário submetidas a *stress* após manuseamento e confinamento (2 minutos) e o grupo controlo, verificou-se que a concentração de células mucosas na superfície da epiderme sofreu uma alteração significativa ao longo do tempo, tendo duplicado 7 dias pós-*stress*, retomando valores semelhantes ao grupo controlo ao 14º dia. Apesar de terem existido diferenças significativas os autores não consideram que a avaliação das células mucosas seja eficiente como indicador de avaliação de *stress*, uma vez que a sua modificação é retardada (Pickering *et al.*, 1982). No entanto, observou-se que em pele de truta-fário exposta a cortisol, *in vitro*, durante 24 horas, a produção de muco aumentou, apesar do número de células mucosas epidérmicas não apresentar alterações significativas (Van der Salm *et al.*, 2002).

A resposta terciária (*stress* crónico) inclui alterações na função do sistema imunológico, na resistência a doenças, no crescimento e desenvolvimento, e no estado reprodutivo dos animais (FSBI, 2002; Wu *et al.*, 2015). O cortisol é um reconhecido elo de ligação entre a condição de *stress* e o estado imunológico em peixes. Quando se verifica um aumento da concentração desta hormona, as células envolvidas na resposta imune que contêm recetores para o cortisol suprimem diversos aspetos da função imune. Trutas-fário com implantes intraperitoneais com libertação de cortisol, sujeitas a *stress* crónico (2 - 4 semanas), evidenciaram um aumento dos níveis de cortisol plasmático desde 1 a 4 ng/mL para 10 ng/mL, o que foi suficiente para aumentar a suscetibilidade

dos animais a agentes patogénicos presentes no meio natural (Pickering e Pottinger, 1985).

A relação entre densidades de manutenção inapropriadas e a redução do crescimento e da competência imunológica tem-se verificado, estando associada a diferentes fatores, como a interação social e deterioração da qualidade da água afetando, consequentemente, o consumo de ração e a eficiência de conversão dos peixes (Yarahmadi *et al.*, 2015). Num trabalho comparativo entre altas e baixas densidades de manutenção de trutas-arco-íris, nos parâmetros utilizados na avaliação do estado imune dos peixes foram incluídos os níveis séricos de lisozima, a contagem de leucócitos e as percentagens de linfócitos, monócitos e neutrófilos. Os valores de lisozima foram significativamente diferentes entre os dois grupos (alta densidade: 296,93 U/mL; baixa densidade: 369,26 U/mL). Os resultados obtidos mostram que trutas-arco-íris mantidas em altas densidades tinham uma contagem significativamente menor de leucócitos. As percentagens de linfócitos, monócitos e neutrófilos não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos, tendo-se verificado que a percentagem de linfócitos e neutrófilos foi maior nos animais mantidos a alta densidade (Yarahmadi *et al.*, 2015). No entanto, num estudo que envolvia a manutenção de salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*), em diferentes densidades num período de 10 semanas, mostrou que a atividade da lisozima aumentou significativamente nas primeiras semanas, o que não aconteceu no restante tempo de ensaio. Este trabalho concluiu que os animais mantidos a baixa densidade apresentavam pesos finais superiores aos mantidos em alta densidade (*stress* crónico). As densidades de manutenção (baixa, média e alta) afetaram significativamente a taxa de crescimento (107,36%; 105,73% e 103,24%, respetivamente), a taxa de crescimento específico (1,04 %/dia; 1,03 %/dia e 1,01 %/dia, respetivamente) e a taxa de conversão alimentar (0,94; 0,96 e 0,98, respetivamente) (Liu *et al.*, 2015).

Num estudo realizado em trutas-fário, induzindo o *stress* nos animais, por manuseamento e confinamento (durante 2 minutos) não foram registadas diferenças significativas nas concentrações de eritrócitos, neutrófilos, trombócitos, relativamente ao grupo controlo, e estas não se alteraram significativamente ao longo do tempo. Os linfócitos mostraram alterações nas suas concentrações ao longo do tempo, nos dois grupos, verificando-se uma concentração menor de linfócitos no grupo manuseado entre as 4 e as 72 horas pós-*stress*. Após 28 dias pós-*stress*, o peso médio corporal e o coeficiente de condição aumentaram, tanto no grupo sujeito a *stress* como no grupo controlo, não tendo sido verificadas diferenças significativas entre os dois grupos relativamente ao peso corporal, ao comprimento e ao fator de condição (Pickering *et al.*, 1982).

1.2.3. Avaliação do stress - Análise comportamental

A utilização de parâmetros comportamentais na avaliação do bem-estar é referida como um indicador sensível das alterações que ocorrem a nível bioquímico e fisiológico em resposta ao *stress*, possuindo a vantagem de se observar facilmente, permitindo tirar conclusões imediatas, não havendo necessidade da utilização de métodos invasivos (Wolffrom, 2004).

A *Fisheries Society of the British Isles* (FSBI) sugeriu uma lista de indicadores práticos, dos quais alguns podem ser utilizados na análise do comportamento (FSBI, 2002): alterações no padrão de coloração corporal; alteração dos movimentos operculares; alterações na natação e noutros padrões de comportamento e redução do alimento ingerido.

As mudanças de cor podem ser classificadas como fisiológicas ou morfológicas. As primeiras são caracterizadas por mudanças de cor rápidas (minutos a horas), envolvendo o movimento de organelos que contêm pigmento no interior dos cromatóforos (Bagnara e Matsumoto, 2006). Esta mudança de cor é transitória e, dependendo dos sinais de estímulo, o animal retoma a coloração original ou adquire um estado intermédio. Por outro lado, as mudanças morfológicas são mais lentas, sendo originadas pela síntese ou destruição de grandes quantidades de pigmento contido na pele, e ocorrem em resposta a um estímulo persistente (Bagnara e Matsumoto, 2006).

Existem vários tipos de células pigmentares, designadas por cromatóforos (expressam diferentes cores devido aos organelos pigmentares que contêm no seu interior), responsáveis pela coloração dos peixes, estando descrita a existência de: melanóforos (preto/castanho), iridóforos (iridescente), leucóforos (branco), xantóforos (amarelo/laranja) e eritróforos (laranja/vermelho), sendo que os primeiros verificam-se tanto na derme como na epiderme (melanóforos dérmicos e epidérmicos), e os restantes localizam-se apenas na derme. Os melanóforos são indicados como os principais responsáveis pelas alterações de cor fisiológicas, apesar dos outros cromatóforos também terem alguma influência (Fujii, 2000). Os melanóforos dérmicos estão envolvidos tanto nas mudanças de cor morfológica, uma vez que são os responsáveis pelo fornecimento da maior parte da pigmentação escura dos peixes, como nas mudanças de cor fisiológica, onde são extremamente ativos. Normalmente, estes cromatóforos encontram-se na porção superior da derme, abaixo da lâmina basal, e caracterizam-se por serem células grandes com amplas dendrites. Os melanóforos epidérmicos estão principalmente envolvidos na mudança de cor morfológica, pelo aumento ou diminuição da melanina depositada na epiderme; a nível das alterações de cor fisiológicas não são significativos por apresentarem uma forma de fuso muito fina. Os restantes cromatóforos

referidos (iridóforos, leucóforos, xantóforos e eritróforos) estão envolvidos tanto nas alterações de cor morfológicas como fisiológicas (Bagnara e Matsumoto, 2006).

Ambas as alterações de cor são mediadas primariamente pela ação da hormona estimulante de melanóforos (MSH - *melanophore-stimulating hormone*). A produção e libertação desta hormona ocorrem na pituitária, através dum estímulo provocado pelo hipotálamo. A atividade mais bem conhecida da MSH é o rápido estímulo da dispersão dos melanossomas no interior dos melanóforos, sendo que na sua ausência os melanóforos assumem configuração contraída, estando os melanossomas concentrados na sua porção central (perinuclear) (Fujii, 2000; Bagnara e Matsumoto, 2006). Nos peixes teleósteos, a maioria dos melanóforos localiza-se na derme (melóforos dérmicos) (Fujii, 2000).

Em tilápia (*Oreochromis mossambicus*) observou-se que, durante um episódio de *stress*, a glândula pituitária, para além de ACTH, liberta α -MSH, que induz a libertação de cortisol no tecido interrenal. A α -MSH é considerada a hormona principal causadora da dispersão dos grânulos de melanina nos melanóforos, provocando o escurecimento da pele (Van der Salm *et al.*, 2004).

Num estudo morfológico da pele de truta-arco-íris, as células pigmentares (cromatóforos), melanóforos, xantóforos e iridóforos verificaram-se apenas na derme. Foram descritas alterações nestas células decorrentes da exposição ao cortisol, sendo a mais notória verificada nos melanóforos, observando-se uma dispersão dos melanossomas através das extensões citoplasmáticas que penetrava a epiderme, provocando um escurecimento visível da pele (Iger *et al.*, 1995).

A alteração dos movimentos operculares em trutas-arco-íris foi realizada pela análise da taxa de ventilação, verificando-se que nos animais sujeitos ao transporte foi sempre elevada (130 respirações por minuto - após transferência para os tanques e 120 respirações por minuto - 48 horas após o transporte), comparativamente aos valores de repouso de $53,1 \pm 3,7$ respirações por minuto (15 °C) (Shabani *et al.*, 2016).

A nível das alterações na natação e de outros padrões comportamentais existem vários parâmetros que podem ser avaliados, como por exemplo: a distribuição na coluna de água; a postura do animal e a atividade locomotora (Merighe *et al.*, 2004; Kittilsen *et al.*, 2009a).

A distribuição vertical na coluna de água foi já utilizada num estudo que analisou o efeito da cor do ambiente a nível do *stress* social em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), com o objetivo de estudar a ocorrência de territorialidade e o desenvolvimento da posição espacial dos animais ao longo do tempo (Merighe *et al.*, 2004).

Durante um episódio de *stress* agudo, a elevada atividade locomotora é tipicamente associada a uma grande produção de cortisol (Kittilsen *et al.*, 2009b). A análise da

atividade locomotora em salmões-do-Atlântico sujeitos a um episódio de *stress* agudo (confinamento), demonstrou a ocorrência de um perfil de natação ativa contra as paredes, assim como comportamentos de fuga. Neste mesmo estudo, a atividade locomotora durante o confinamento mostrou uma correlação linear positiva com as taxas de liberação de cortisol (Kittilsen *et al.*, 2009a). Contrariamente, em trutas-arco-íris após transporte os animais denotavam uma menor atividade, observando-se uma natação calma e uma distribuição uniforme nos tanques. Após 24 horas os animais estavam mais próximos, encontrando-se numa protuberância existente no fundo do tanque, perto do fundo, verificando-se apenas natação esporádica (Shabani *et al.*, 2016). A alteração do comportamento natatório é igualmente influenciada pela presença de outros indivíduos no tanque, como reportado em trutas-arco-íris juvenis, em que a percentagem de tempo de movimentação dos indivíduos isolados, com concentrações médias de cortisol < 10 ng/mL, foi menor comparativamente aos indivíduos sujeitos à junção de um coespecífico de tamanho inferior, com concentrações médias de cortisol < 60 ng/mL (Øverli *et al.*, 2002).

A inibição do apetite é bastante proeminente em salmonídeos sujeitos a *stress*, sendo em parte mediada por neurotransmissores e hormonas envolvidas na resposta fisiológica ao *stress*. A avaliação deste parâmetro pode ser realizada através da verificação do tempo que decorre até à retoma da alimentação e da reação que os animais têm quando o alimento é administrado (Kittilsen *et al.*, 2009a). Em trutas-fário sujeitas a um episódio de *stress* agudo (manipulação + confinamento), verificou-se um decréscimo acentuado do alimento ingerido, nos três dias seguintes (Pickering *et al.*, 1982). Tipicamente, em peixes sujeitos a *stress*, verifica-se uma redução da atividade alimentar; no entanto, a mesma resposta ao *stress* pode originar um aumento no gasto de energia, que tem que ser compensada. Esta compensação pode ser verificada através de um aumento do consumo de oxigénio e pela existência de uma rápida taxa de perda de proteínas e lípidos (Tocher e Glencross, 2015).

Através da análise de parâmetros bioquímicos e fisiológicos foram verificados níveis de *stress* elevados em carpas comuns aclimatadas a temperaturas de 32 °C. Estes animais apresentaram perda de apetite, natação irregular e ingestão de ar à superfície da água (Ahmad *et al.*, 2011).

1.3. *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758)

A espécie *Salmo trutta* está integrada no reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Actinopterygii*, ordem *Salmoniformes*, família *Salmonidae* e género *Salmo* (Santos, 2014; IUCN, 2016).

Em Portugal é comercialmente denominada por truta-marisca ou truta-comum (DR, 2004), e em inglês é comumente referida como *sea trout* ou *brown trout* (IUCN, 2016). O estatuto de conservação desta espécie a nível mundial, segundo a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), indicado no livro vermelho das espécies ameaçadas, é referido como pouco preocupante (IUCN, 2016).

A nível morfológico, nos exemplares adultos o tipo de coloração mais frequente caracteriza-se por um dorso castanho a cinzento esverdeado, flancos acastanhados ou acinzentados (onde se verificam manchas negras e vermelhas/alaranjadas) e ventre amarelado ou esbranquiçado. Os animais juvenis apresentam o mesmo tipo de coloração, mas com tonalidades mais escuras comparativamente aos adultos. A coloração das trutas-fário altera-se mediante vários fatores, como a idade, qualidade da água, *habitat* e estação do ano (Novais, 2012; Santos, 2014). O comprimento e o peso máximo dos animais variam dependendo do *habitat* onde se encontram, no rio 70 cm e 4 a 5 kg e no lago 100 cm e 15 kg (Novais, 2012). Na Península Ibérica raramente são encontrados indivíduos com mais de 50 cm e 2 kg (Santos, 2014), e em Portugal as dimensões mais frequentes situam-se entre os 20 e os 40 cm (Novais, 2012). Embora exista o registo de trutas capturadas com 20 anos de idade, a maioria vive menos tempo, sendo que nas populações anádromas é raro viverem mais de 10 anos (Novais, 2012).

Esta espécie é indígena dos rios da Europa, norte de África e parte da Ásia, a norte dos Himalaias (Lourenço, 2004; Rocha, 2011), estando distribuída essencialmente na Europa (Novais, 2012). Nos finais do séc. XIX e na primeira metade do séc. XX, implementou-se a introdução desta espécie em pelo menos 24 países não pertencentes à Europa, passando a ter uma distribuição mundial (Novais, 2012). Em Portugal encontra-se nas bacias hidrográficas dos rios Minho, Lima, Cávado, Ave, Douro, Vouga e Mondego, e ainda na região noroeste do Rio Tejo (Lourenço, 2004).

É considerada como sendo um bom bioindicador da qualidade de massas de água doce a nível mundial, por ser exigente em termos de habitat e qualidade da água (Novais, 2012). Encontra-se em rios com águas correntes e frias (resistindo mal a temperaturas superiores a 22 °C), preferindo zonas bem oxigenadas, com saturações a rondar os 80%, e com elevada velocidade de corrente (Lourenço, 2004; Rocha, 2011). A profundidade da água tem especial importância na escolha do habitat, uma vez que, com o aumento do tamanho, os animais preferem zonas de correntes mais profundas (Novais, 2012). Apesar de terem capacidade para uma natação ativa, passam a maior parte do tempo junto ao fundo onde vivem e se alimentam (Rocha, 2011; Novais, 2012).

Esta espécie é carnívora, utilizando a predação para a captura do alimento. Enquanto os alevins e os juvenis ingerem essencialmente invertebrados aquáticos, comendo raramente invertebrados terrestres e pequenos peixes, os adultos, para além dos

invertebrados, também se alimentam de peixes e anfíbios. A dieta exata varia de acordo com o habitat, a estação do ano, o tamanho e a idade dos animais (Rocha, 2011; Santos, 2014).

A maturidade sexual é atingida aos dois anos nos machos e aos três nas fêmeas (Rocha, 2011). A altura da reprodução ocorre no Outono ou Inverno, sendo que em Portugal se verifica entre Novembro e Dezembro (Lourenço, 2004; Santos, 2014). Nesta altura os animais concentram-se em locais preferencialmente pouco profundos, com cascalho grosseiro e corrente rápida. Após o primeiro ano de vida, os alevins migram para outros rios, para lagos, ou para estuários, ou permanecem no rio de origem (Lourenço, 2004; Rocha, 2011).

Existe alguma polémica na classificação taxonómica da espécie *Salmo trutta* uma vez que existem diferentes grupos morfológicos e genéticos identificados (Lourenço, 2004). Dentro desta espécie são considerados diferentes morfotipos (também designados por espécies ou subespécies) referentes aos distintos ambientes onde os animais são encontrados (Novais, 2012), existindo em Portugal (Lourenço, 2004):

- *Salmo trutta* f. *trutta* - comumente denominada por truta-marisca. Realiza migração anádroma, crescendo no mar e migrando para água doce com o objetivo de se reproduzir (Lourenço, 2004; Novais, 2012). É autóctone do nosso país e encontra-se apenas nas bacias hidrográficas do Minho e Lima, sendo então, pouco abundante e está classificada no estatuto de conservação como criticamente em perigo (Lourenço, 2004; Novais, 2012; ICNF, 2016).
- *Salmo trutta* f. *lacustris* - conhecida vulgarmente por truta-lacustre ou truta-de-lago, por viver em lagos. Em 2004, não existiam exemplares no nosso país, no entanto, foi realizada uma tentativa da sua introdução (Lourenço, 2004).
- *Salmo trutta* f. *fario* - designada vulgarmente por truta-fário, truta-de-rio, truta-comum, truta-dos-regatos, truta-sapeira ou truta-pinta (Lourenço, 2004; Novais, 2012; Santos, 2014). Vive exclusivamente em água doce. É autóctone, sendo frequente nas bacias hidrográficas dos rios Minho, Lima, Cávado, Ave, Douro, Vouga e Mondego e na região Noroeste da bacia do rio Tejo. (Lourenço, 2004; Novais, 2012), está classificada no estatuto de conservação como pouco preocupante (ICNF, 2016). Este morfotipo pode ainda ser designado por: *Salmo trutta* forma *fario* (Kaya e Erdem, 2009); *Salmo trutta* morfa *fario* (Novais, 2012); *Salmo trutta* m. *fario* (Zalewski *et al.*, 1985); *Salmo trutta* ssp. *fario* (Lourenço, 2004) e *Salmo trutta fario* (Castro *et al.*, 1999).

1.4. Objetivos

A condição física do animal é a medida de bem-estar mais utilizada, podendo ser verificada através do fator de condição, da existência de anomalias morfológicas ou lesões, resultantes de agressão provocada por coespecíficos, da ocorrência de doenças, redução da taxa de crescimento, e inibição da capacidade reprodutiva (FSBI, 2002; Huntingford e Kadri, 2008).

Tem sido amplamente discutido que para uma correta avaliação do bem-estar animal é necessário verificar a condição física, o estado fisiológico e comportamental dos indivíduos, uma vez que nenhum destes itens é confiável isoladamente, apesar de estarem interrelacionados (Oliveira e Galhardo, 2007; Huntingford e Kadri, 2008; Ross e Ross, 2008b). O estudo das alterações comportamentais em resposta a condições adversas é vantajoso, já que muitas das vezes é possível inferir essas perturbações rapidamente através de observação direta dos animais (Wolffrom, 2004).

Apesar de ser recomendado legalmente um período de aclimação dos animais utilizados em experimentação científica (UE, 2010), na literatura específica em peixes, na grande maioria dos casos apenas é referido o tempo de aclimação realizado (Pickering *et al.*, 1982; Flodmark *et al.*, 2002; Acerete *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016), não estando claros os métodos empregues para a verificação do bem-estar dos animais, nem se ocorre a retoma do seu estado normal ao longo do tempo estipulado. Acresce o fato de especificamente em peixes, os lotes experimentais serem frequentemente adquiridos e transportados para o laboratório antes do início do estudo, o que associa uma condição de *stress* prévia que provoca mudanças no estado fisiológico e comportamental do animal que perduram durante um período subsequente (Obernier e Baldwin, 2006). Por este motivo, é de extrema importância que o animal restabeleça a sua homeostasia e retome o seu estado fisiológico e comportamental, de forma a garantir que o estudo não é enviesado pelas alterações provocadas pelo *stress* sofrido (Obernier e Baldwin, 2006).

Contudo, existe um número muito limitado de dados relativos ao tempo ideal de aclimação em espécies de peixe, e a maioria foca-se apenas na avaliação da alteração de um parâmetro específico, por exemplo a temperatura da água (Wysocki *et al.*, 2009; Logan e Somero, 2010) ou a salinidade (Urbina *et al.*, 2013), e na análise da resposta dos animais perante essa mudança.

Neste contexto, a presente dissertação tem como principal objetivo estabelecer e parametrizar o tempo mínimo e ideal de aclimação de indivíduos juvenis de *Salmo trutta* f. *fario* (truta-fário), com aproximadamente 1 ano de idade, em condições laboratoriais (em biotério), após um episódio de *stress* agudo (transporte). Para tal, monitorizaram-se

os animais durante 42 dias (com amostragens periódicas às 12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias) após o episódio de transporte. Selecionaram-se um conjunto de parâmetros considerados como potenciais alvos para monitorizar a evolução dos animais ao longo do tempo. A análise multiparamétrica incluiu entre outros: parâmetros comportamentais (localização dos animais no tanque, movimentação dos peixes, posição vertical dos peixes no tanque, existência de movimentações anormais e coloração dos peixes); perfil alimentar (análise do tempo em que o primeiro peixe reagiu ao alimento, reação dos animais ao alimento e quantidade de ração consumida); condição física (peso, fator de condição, comprimento total e *standard*, peso fígado e rim, índice hepatossomático e nefrossomático); bioquímica sanguínea/plasmática (incluindo valores de colesterol, triglicerídeos, glucose, hemoglobina, potássio, e percentagem do hematócrito). Complementarmente, realizaram-se outras determinações como a análise qualitativa da cor dos animais, e avaliação quantitativa das áreas pigmentadas dos fragmentos e dos cortes histológicos de pele; a análise histo-morfológica do rim anterior, a determinação do cortisol por imuno-histoquímica, a análise estereológica do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais e a quantificação dos níveis plasmáticos do cortisol. Pretende-se no final aferir um conjunto de ferramentas que no seu conjunto permitam a avaliação da condição física, e dos estados fisiológico e comportamental dos animais após um episódio de *stress*, o que possibilitará estabelecer o tempo necessário para que trutas-fário juvenis retomem o seu estado de bem-estar, pelo menos nas condições aqui descritas.

A eleição da truta-fário como modelo experimental neste estudo baseou-se desde logo no interesse económico desta espécie autóctone, associado ao seu uso em diversas áreas de investigação. Adicionalmente, têm sido realizados estudos *in vivo* (Schubert *et al.*, 2008) e *in vitro* (Madureira *et al.*, 2015; Madureira *et al.*, 2016) em truta-fário que assumem um período de aclimação, muitas vezes com base em parâmetros *major*, incluindo a reação ao alimento e a condição física dos animais. Assim, com este estudo é expectável definir sistematicamente critérios mais refinados, idealmente não invasivos, indicativos do estado de *stress*, em condições experimentais nesta espécie em particular.

Capítulo 2. Material e métodos

2.1. Sistema de ensaio e animais

O sistema de ensaio consistiu em 9 tanques, cada um com uma capacidade total para 126 L. Os animais foram mantidos em aproximadamente 100 L de água doce desclorada no decorrer de toda a experiência. Previamente ao início do ensaio, em todos os tanques foram ativados os filtros biológicos de forma a garantir valores de amónia não ionizada - amoníaco (NH_3) e nitrito (NO_2^-) adequados ao intervalo recomendado para a espécie ($< 0,02 \text{ mg/L}$ e $0,1 \text{ mg/L}$, respetivamente) (MacIntyre *et al.*, 2008). Para a ativação do filtro biológico, a cada um dos tanques foi acoplado um filtro externo (SunSun®, HW-402, 1000 L/h) com biobolas e lã de vidro e inserida uma pedra difusora, alimentada por uma bomba de ar (Resun®, LP-60; 70 L/min). Periodicamente, tendo em conta os valores de NH_3 e NO_2^- medidos, foi adicionado cloreto de amónio (NH_4Cl), de modo a manter a atividade e a proliferação do filtro biológico. Antes da introdução dos animais no sistema de ensaio os valores médios de NH_3 e NO_2^- registados foram de $0,000 \text{ mg/L}$ ($\pm 0,000$) e $0,005 \text{ mg/L}$ ($\pm 0,007$), respetivamente.

Para o ensaio foram adquiridos ao Posto Aquícola do Torno (Amarante, Portugal) cerca de 180 juvenis de truta-fário (*Salmo trutta* f. *fario*), com aproximadamente um ano de idade, tendo o seu transporte demorado aproximadamente 2 horas e 30 minutos. Todos os procedimentos com os animais foram realizados em conformidade com o Decreto-Lei Português No. 113/2013 (DR, 2013) que transpõe a Diretiva n.º 2010/63 da UE sobre a proteção dos animais para fins científicos (UE, 2010).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente pelos 9 tanques, tendo ficado cada um deles com aproximadamente 20 peixes. Em cada um dos tanques foi instalada uma rede de proteção, e nos tanques da bateria I foi colocado um espelho (com inclinação de 45°), como ilustrado na Figura 2A, facilitando assim a visualização dos animais com a mínima interferência externa possível. A localização da adução de água, assim como da pedra difusora foi previamente definida no mesmo local em todos os tanques. O fotoperíodo fixado foi de 12/12 horas de luz/escuridão, segundo regulação automatizada da luz artificial existente no biotério.

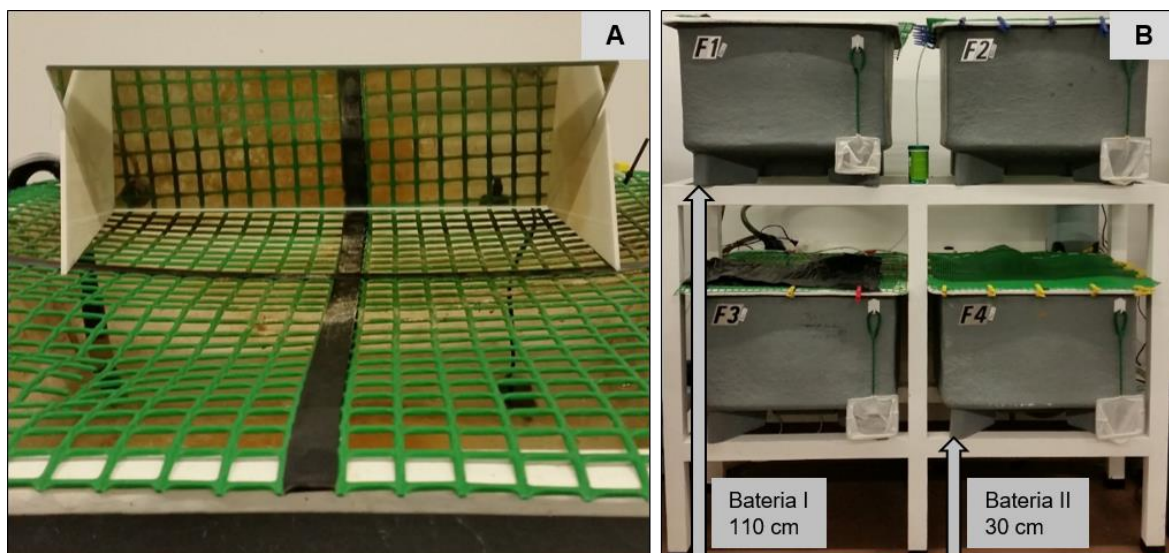


Figura 2. Sistema de ensaio. A - Espelho colocado em cima da rede de proteção dos tanques da bateria I, para permitir a visualização dos animais; B - Representação de 4 tanques constituintes do sistema de ensaio com indicação da altura a que cada uma das baterias (I e II) se encontrava do chão.

2.2. Desenho experimental

O ensaio teve uma duração total de 42 dias, com início a 19 de maio de 2015 e termino a 30 de junho do mesmo ano. Os 9 tanques foram distribuídos de forma randomizada conforme indicado na Figura 3.

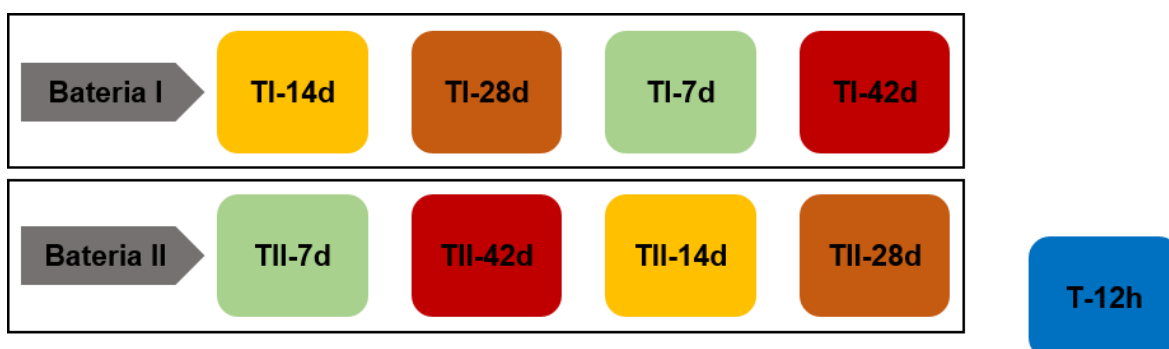


Figura 3. Esquema da distribuição dos tanques do sistema de ensaio. T - Tanque; I ou II – Bateria I ou II; 12h, 7d, 14d, 28d, e 42d - tempo após a chegada dos animais, horas (h) ou dias (d), em que foi realizada a colheita.

Os tanques foram propositadamente divididos em duas baterias localizadas em dois patamares de altura, com exceção do T-12h que estava colocado ao nível do chão. A bateria I, constituída pelos tanques localizados no patamar superior (a 110 cm do chão), denominados de TI (tanque I), e a bateria II constituída pelos tanques do patamar inferior

(a 30 cm do chão), denominados de TII (tanque II) (Figura 2B). A existência destes dois patamares permitiu diferenciar estes dois grupos, TI e TII, com base na percepção visual que os animais tinham do meio que os rodeava.

As colheitas realizaram-se às 12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias após a chegada dos animais. Os tanques correspondentes a cada um dos dias de amostragem foram atribuídos aleatoriamente entre a bateria I e II.

Durante o ensaio registou-se a mortalidade em cada um dos tanques, bem como uma série de parâmetros físico-químicos e comportamentais que serão objeto de maior detalhe nos tópicos seguintes.

2.2.1. Parâmetros físico-químicos da água

Diariamente numa fase inicial e em dias alternados numa fase pós-estabilização dos sistemas foram analisados vários parâmetros da água, nomeadamente: NH_3 (mg/L), NO_2^- (mg/L) (Fotómetro Palintest®, 7000 SE e pastilhas de NH_3 - PM 152 e NO_2^- - PM 109), cloro (mg/L) (Sera®, Cl-Test), dureza ($^\circ\text{dGH}$) (Sera®, gH-Test), pH (WTW, pH 530), temperatura ($^\circ\text{C}$) e oxigénio dissolvido (mg/L) (HACH®, HQD 40d multi). Adicionalmente foi realizado o cálculo da alcalinidade, tendo em conta que, 1 $^\circ\text{dGH}$ é igual a 17,9 mg/L de CaCO_3 (Porto, 2014). Os valores de referência são apresentados na Tabela 3.

A seleção dos tanques para a amostragem de água foi realizada alternando entre os tanques TI e TII, sendo a água de cada tanque analisada a cada dois dias numa fase inicial, e de quatro em quatro dias numa fase posterior do ensaio, até ao respetivo dia da colheita dos animais. Nos casos em que se verificaram valores superiores aos recomendados efetuaram-se trocas de água parciais com controlo diário dos parâmetros até se atingir os níveis ideais para a espécie.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água recomendados para peixes salmonídeos (MacIntyre et al., 2008) e truta (Molony, 2001).

Parâmetros da água	Limites recomendados
pH	6,5-8,5
Alcalinidade (CaCO_3)	> 20 mg/L
Amónia não ionizada	< 0,02 mg/L
Cloro	< 0,003 mg/L
Nitrito	< 0,1 mg/L
Oxigénio dissolvido	7 mg/L
Temperatura	9-22 $^\circ\text{C}$

2.2.2. Registo comportamental

O registo comportamental foi efetuado diariamente, intercalando o período da manhã com a tarde, de acordo com o reportado na Figura 4. A observação foi realizada em cada tanque durante um período total de 5 minutos, com registos de minuto a minuto, onde foram observados diferentes parâmetros (Figura 4 A a E). Em alguns casos (B, C e E), para cada um dos parâmetros foi atribuído um grau numérico que variou de 0 (alteração ao padrão normal de comportamento) a 1 (padrão normal de comportamento), de forma a permitir a posterior análise dos dados. Os parâmetros observados foram selecionados e adaptados de outros trabalhos publicados na área da análise comportamental de peixes (Merighe *et al.*, 2004; Wolffrom, 2004; Kittilsen *et al.*, 2009a).

	Data:				Tanque:						
	Nº do registo:				Hora início:						
	Min.	1		2		3		4		5	
A	Localização	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
		4	3	4	3	4	3	4	3	4	3
B	Movimentação	P 0	M 1	P 0	M 1	P 0	M 1	P 0	M 1	P 0	M 1
C	Posição vertical no tanque	FT 0	CA 1	FT 0	CA 1	FT 0	CA 1	FT 0	CA 1	FT 0	CA 1
D	Movimentação anormal (nº)										
E	Coloração	EM 0	MC 1	EM 0	MC 1	EM 0	MC 1	EM 0	MC 1	EM 0	MC 1

Figura 4. Folha de registo do comportamento dos peixes. As setas A a E assinalam os diferentes parâmetros observados. O registo foi realizado a cada minuto, durante 5 minutos. Para o parâmetro A (Localização), 1 a 4 e o quadrado vermelho indicam a secção de localização dos animais; para os parâmetros B (Movimentação), C (Posição vertical no tanque) e E (Coloração) 0 e 1 discriminam a alteração ao padrão normal de comportamento e padrão normal de comportamento, respetivamente; para o parâmetro B (Movimentação), P - parados e M - em movimento; para o parâmetro C (Posição vertical no tanque), FT - fundo do tanque e CA - coluna de água; para o parâmetro E (Coloração), EM - coloração escura/média e MC - coloração média/clara.

De acordo com a folha de registo apresentada na Figura 4 avaliaram-se os seguintes parâmetros comportamentais:

A. Localização – Registo da secção do tanque onde os peixes se encontravam durante o minuto de observação. Cada tanque foi dividido em 4 quadrantes iguais, existindo uma 5ª secção ao centro do tanque (indicada a vermelho na Figura 4). A localização dos peixes foi registada em função da posição ocupada por mais de 50% dos animais, em uma ou mais secções.

B. Movimentação – O registo foi realizado atendendo se mais de 50% dos peixes se encontravam parados ou em movimento.

1) **P (parados)** – Mais de 50% dos peixes encontravam-se no mesmo local do tanque durante o minuto de observação, não existindo uma natação fluente. Grau atribuído: 0.

2) **M (em movimento)** – Mais de 50% dos peixes deslocavam-se pelo tanque, sendo nítida a existência de natação, excluindo-se a movimentação provocada pela deslocação da água. Grau atribuído: 1.

C. Posição vertical no tanque – O registo foi realizado pela verificação de que aproximadamente 50% dos peixes se encontravam na coluna de água ou pousados no fundo do tanque.

1) **FT (fundo do tanque)** – Aproximadamente 50% dos peixes encontravam-se pousados no fundo do tanque, não se verificando movimento das barbatanas peitorais. Grau atribuído: 0.

2) **CA (coluna de água)** – Aproximadamente 50% dos peixes, parados ou em movimento, localizavam-se na coluna de água, verificando-se movimento das barbatanas peitorais. Grau atribuído: 1.

D. Movimentação anormal – Os peixes apresentavam comportamentos de natação anormais, tanto a nível da velocidade de natação como da sua posição em relação à coluna de água. O registo foi efetuado indicando o número de vezes em que se verificou movimentação anormal durante o minuto de observação.

E. Coloração – O registo foi feito em função da observação da cor de mais de 50% dos peixes.

- 1) **EM (escura/média)** – Cerca de 50% dos peixes apresentavam uma cor entre escura a média. Grau atribuído: 0.
- 2) **MC (média/clara)** – Cerca de 50% dos peixes apresentavam uma cor entre média a clara. Grau atribuído: 1.

2.2.3. Registo comportamental alimentar

O registo comportamental alimentar foi efetuado em dias consecutivos, até os animais começarem a reagir ao alimento, e em dias alternados no restante período de tempo, por norma no período da manhã, de acordo com o procedimento detalhado na Figura 5. A observação foi realizada em cada tanque durante um período de 5 minutos, observando diferentes parâmetros (F a H). Em alguns parâmetros, a cada uma das categorias foi atribuído um grau numérico, sendo que para a reação dos peixes ao alimento (G), variou entre o grau 0 e 3 (grau 0 - maior alteração ao padrão normal de comportamento e grau 3 - padrão normal de comportamento) e para a ração consumida (H) o grau variou entre 0 e 2 (grau 0 - maior alteração ao padrão normal de comportamento e grau 2 - padrão normal de comportamento). Os parâmetros registados basearam-se em dados já publicados na literatura para este tipo de análise (Wolffrom, 2004; Kittilsen *et al.*, 2009a).

	Data:		Tanque:	
	Nº do registo:		Hora início:	
	Tempo de observação: 5 minutos			
F	Tempo de reação	Tempo em que o primeiro peixe reagiu ao alimento (segundos)		
	G Reação dos peixes ao alimento	Mais de 50% dos peixes não reage ao alimento.		0
		Mais de 50% dos peixes come apenas a ração que cai à sua frente, não se movimentando para apanhar o alimento.		1
		Mais de 50% dos peixes movimenta-se em direção à ração, mas volta à sua posição inicial nos intervalos das capturas.		2
		Mais de 50% dos peixes movimenta-se continuamente ao longo do tanque em busca do alimento.		3
	H Ração consumida	Até 1/3 da ração foi consumida.		0
		1/3 a 2/3 da ração foi consumida.		1
		Mais de 2/3 da ração foi consumida.		2

Figura 5. Folha de registo do comportamento alimentar dos peixes. As setas F a H indicam os diferentes parâmetros avaliados. A observação foi realizada durante 5 minutos. Para os parâmetros G (Reação dos peixes ao alimento) e H (Ração consumida), 0 representa o grau de maior alteração ao padrão normal de comportamento, e 3 (G) e 2 (H), descrevem o padrão normal de comportamento.

De acordo com a folha de registo apresentada na Figura 5 consideraram-se os seguintes parâmetros na avaliação do comportamento alimentar:

F. Tempo de reação – Registo do intervalo de tempo (em segundos) desde a introdução da ração no tanque até à ingestão por pelo menos um peixe.

G. Reação dos peixes ao alimento – Registo da reação dos peixes ao alimento durante o tempo de observação. Este parâmetro dividiu-se em 4 categorias, sendo assinalada apenas uma:

- 1) Mais de 50% dos peixes não reage ao alimento. Grau atribuído: 0.
- 2) Mais de 50% dos peixes come apenas a ração que cai à sua frente, não se movimentando para apanhar o alimento. Grau atribuído: 1.
- 3) Mais de 50% dos peixes movimenta-se em direção à ração, mas volta à sua posição inicial nos intervalos de captura. Grau atribuído: 2.
- 4) Mais de 50% dos peixes movimenta-se continuamente ao longo do tanque em busca de alimento. Grau atribuído: 3.

H. Ração consumida – Este parâmetro foi dividido em 3 categorias, definidas em função da proporção de alimento ingerido pelos animais de cada tanque.

- 1) Até 1/3 da ração foi consumida (até 8,33 g). Grau atribuído: 0.
- 2) 1/3 a 2/3 da ração foi consumida (de 8,34 a 16,66 g). Grau atribuído: 1.
- 3) Mais de 2/3 da ração foi consumida (de 16,67 a 25 g). Grau atribuído: 2.

O intervalo de ração em gramas correspondente a cada categoria foi definido atendendo à quantidade máxima de ração estabelecida para administrar a cada tanque (25 g). O cálculo desta quantidade teve como base um estudo de Elliott (1976), para trutas-fário com 50 g, que refere que estas atingem um estado ótimo de energia quando consomem diariamente entre 2200 e 1700 calorias aproximadamente, para temperaturas da água entre os 16 e 19,5° C, respetivamente. Aproximadamente 2% do peso médio vivo de cada animal foi administrado, correspondendo a cerca de 2210 calorias diárias.

Os animais foram alimentados em dias alternados, com ração específica para a espécie (MicroBalance™, T-4 Optiline-sf 2P, energia digestível - 18,5 MJ/kg: proteína bruta - 43%; gordura bruta - 23%; cinzas - 5%; celulose - 3%; proteína total - 0,8%). Após se aferir o ponto a partir do qual os animais começavam a reagir ao alimento, a ração foi administrada de forma faseada. De referir que, no dia anterior às colheitas, os animais não foram alimentados.

2.3. Colheitas

Em cada colheita foram amostrados entre 12 a 15 animais (6 a 8 animais/tanque, quando aplicável) de forma aleatória, tendo sido efetuado o procedimento resumido e ilustrado na Figura 6.

Para a eutanásia dos animais usou-se uma solução de 0,6 mL/L (dose considerada letal para salmonídeos) de etileno-glicol-monofenil-éter (Merck) (Iwama e Ackerman, 1994) (Figura 6A). Seguidamente, fotografou-se o corpo inteiro do animal (Canon EOS 450D), pesou-se (Figura 6B) e mediu-se o comprimento total e *standard* (cm). Através da veia caudal foi recolhido o máximo de sangue possível (seringa de insulina 1 mL; agulha 25G x 5/8") (Figura 6C), sendo este imediatamente transferido para um tubo revestido com heparinato de lítio (Vacuette, 1 mL) e devidamente agitado garantindo o contato eficaz do sangue com o anticoagulante. O sangue foi utilizado no momento da colheita para a análise bioquímica (descrita detalhadamente no ponto 2.5) e para determinar a percentagem do microhematócrito. Para o hematócrito, o sangue foi transferido para tubos de microhematócrito não heparinizados (comprimento aproximado: 75 mm +/- 0,5 mm e Ø interno: 1,1-1,2 mm) e centrifugado a 14 500 g durante 5 minutos (LW Scientific, Combo V24), à temperatura ambiente (Figura 6D). O sangue sobranete destas determinações foi centrifugado a 800 g durante 10 minutos (VWR®, Micro Star 12) e o plasma obtido guardado a -20 °C para a determinação posterior dos níveis de cortisol (ver tópico 2.7.4).

Adicionalmente, dois fragmentos retangulares de pele, com cerca de 0,8 cm² (aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,8 cm de largura), um de cada lado do peixe, foram retirados de um ponto médio entre a linha média e a barbatana dorsal do animal (Figura 6E). Procedeu-se ao registo fotográfico dos fragmentos (Figura 6F), utilizando um estereomicroscópio (Olympus, SZX10), acoplado com uma máquina fotográfica digital (Olympus, DP21). Todas as fotografias foram adquiridas com uma ampliação de 1,25x. Após o registo fotográfico, os fragmentos de pele foram fixados numa solução de formalina tamponada a 10%. Finalmente, o fígado e o rim (Figura 6G) foram extraídos e pesados, tendo sido realizada, de imediato, a separação da porção posterior e anterior do

rim (corte feito 0,5 cm abaixo da base dos lóbulos do rim anterior) (Figura 6H). A porção posterior foi descartada, pesando-se isoladamente a porção anterior que, juntamente com os outros órgãos, foi fixada em formalina tamponada a 10%.

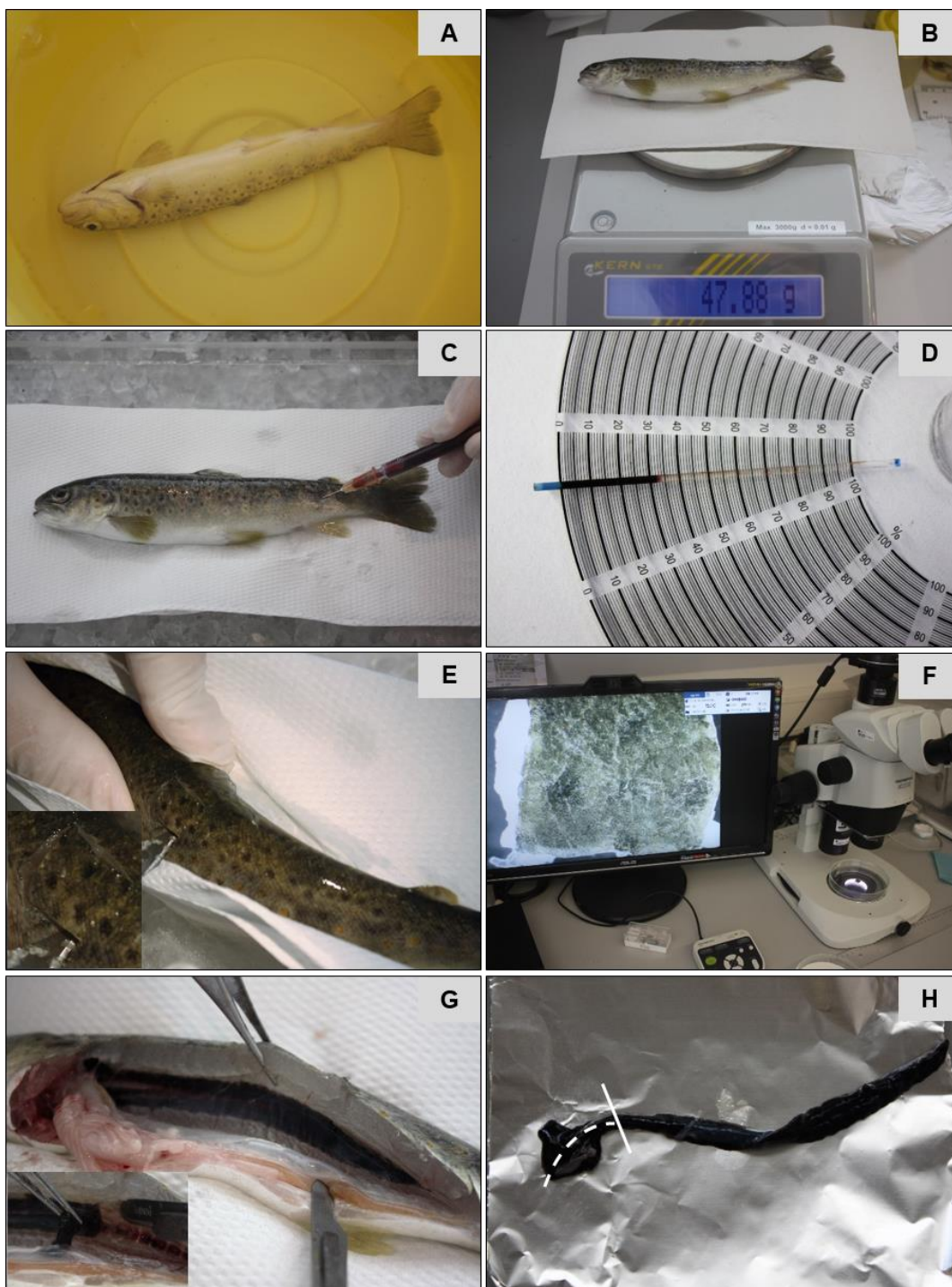


Figura 6. Esquema resumido do procedimento de amostragens. A - Eutanásia; B - Pesagem; C - Colheita de sangue; D - Determinação da percentagem de microhematócrito; E e F - Colheita e fotografia dos fragmentos de pele; G e H - Colheita do rim (linha a cheio – zona do corte realizado para separar o rim anterior do rim posterior; linha a tracejado – zona do corte para separação dos lóbulos do rim anterior).

Posteriormente foram calculados os índices somáticos do fígado e do rim, através da fórmula: (peso do órgão (g)/peso do animal (g)) x 100 (Sanchez *et al.*, 2008) e o fator de condição (de Fulton) aplicando a fórmula: $100 \times (\text{peso do animal (g)} / \text{comprimento total (cm)}^3)$ (Froese, 2006).

2.4. Processamento histológico

Os fragmentos de pele e de rim anterior permaneceram durante 48 horas na solução fixadora e, findo esse período, foram transferidos para etanol a 70% até ao processamento. Antes do processamento histológico, o rim anterior foi cortado ao meio, pelo septo conjuntivo, de modo a separar os dois lóbulos, de acordo com a Figura 6H.

O processamento histológico dos fragmentos seguiu um protocolo de rotina num processador automático (Leica, TP1020), de acordo com a Figura 7.

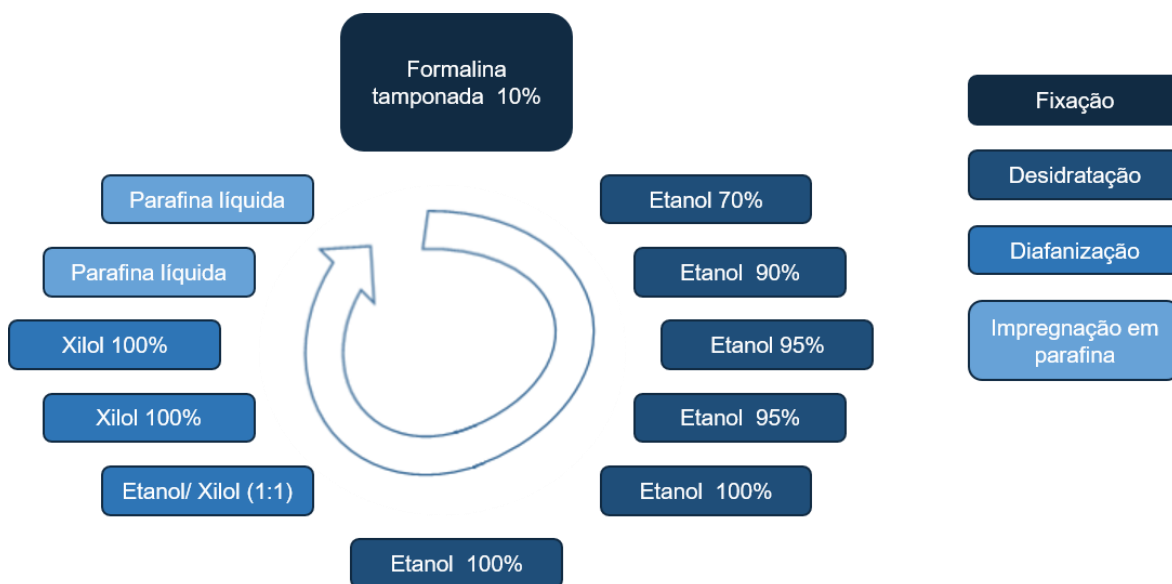


Figura 7. Esquema representativo do processamento histológico de rotina. Cada etapa teve um período de duração de 1 hora, com exceção da formalina tamponada a 10% e o etanol a 70% (48 horas em cada).

A inclusão foi realizada utilizando um aparelho de inclusão (Leica, EG 1140 H). Os fragmentos de pele foram incluídos orientando os fragmentos de modo a que o corte fosse realizado no sentido crânio/caudal, ou vice-versa. Os fragmentos de rim anterior foram incluídos em conjunto, orientando a zona de separação dos lóbulos (linha a tracejado Figura 6H) para a face de corte.

2.5. Análise bioquímica do sangue e plasma

As análises bioquímicas do sangue foram realizadas no equipamento Reflotron Plus (Roche Diagnostics), tendo-se determinado os valores de colesterol (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL), glucose (mg/dL), hemoglobina (g/dL) e potássio (mmol/L), usando as tiras reativas Reflotron específicas, de acordo com as recomendações do manual. Para cada análise usou-se 32 μ L de sangue heparinizado, exceto no caso da determinação do potássio que foi realizada em plasma heparinizado. Periodicamente, efetuaram-se medições-controlo (tiras Reflotron Check), por forma a garantir o funcionamento do sistema ótico do equipamento.

Sempre que os valores dos parâmetros analisados se encontravam abaixo do limite de quantificação do equipamento foi considerado um valor imediatamente abaixo do mínimo passível de ser medido. Assim para o colesterol, triglicerídeos, hemoglobina e potássio consideraram-se os seguintes valores: 99,9 mg/dL, 69,9 mg/dL, 4,99 g/dL e 1,99 mmol/L, respetivamente.

2.6. Análise da pele

2.6.1. Determinação qualitativa da cor da pele

Esta determinação foi realizada utilizando um referencial de 4 fotografias modelo correspondentes a diferentes magnitudes de coloração da pele do corpo inteiro dos animais, às quais foram atribuídos graus numéricos de 0 a 3. As fotografias foram classificadas como: cor escura (grau 0), cor intermédia escura (grau 1), cor intermédia clara (grau 2) e cor clara (grau 3) (Costa *et al.*, 2016).

As fotografias do corpo inteiro dos animais amostrados a cada um dos tempos foram comparadas com as fotografias modelo (Anexo I) e foi-lhes atribuído o grau correspondente.

2.6.2. Determinação quantitativa da área pigmentada em fragmentos de pele

A partir das fotografias dos fragmentos de pele determinou-se a percentagem de área pigmentada, em cada uma das imagens, recorrendo ao programa ImageJ (versão 1.4.3.67) (Rasband, 1997). Em resumo, após a delimitação duma área central no fragmento de pele, correspondente a aproximadamente 0,45 cm x 0,45 cm (representada pelo quadrado amarelo na Figura 8A) efetuou-se um corte da imagem, obtendo-se

apenas a área selecionada para análise (Figura 8B). A imagem resultante foi convertida num binário preto e branco (Figura 8C), a partir do qual se obteve a percentagem de área escura, ou seja, a percentagem de área pigmentada (Costa *et al.*, 2016).

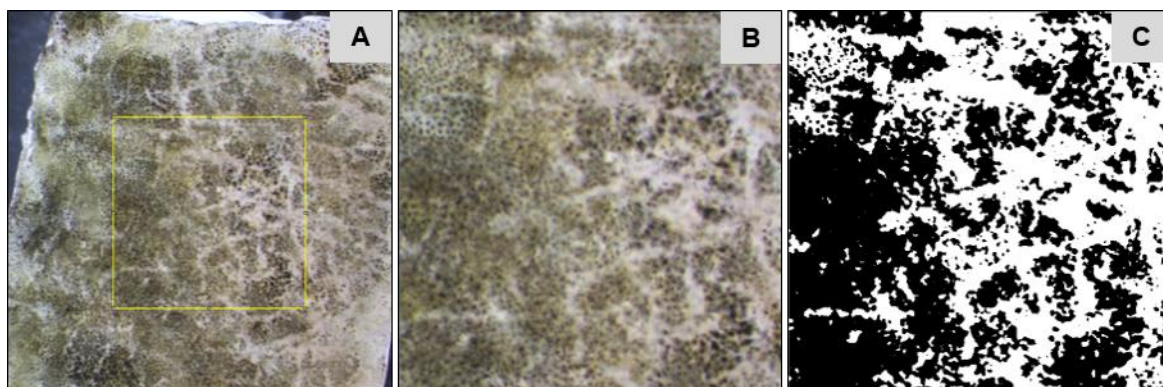


Figura 8. Determinação quantitativa da área pigmentada nos fragmentos de pele. A - Seleção de uma área central no fragmento de pele; B - Imagem da área selecionada, após corte da imagem em A; C - Binário preto e branco da imagem B.

2.6.3. Determinação quantitativa da área pigmentada em cortes histológicos de pele

Um dos fragmentos de pele de cada animal, escolhido aleatoriamente, foi cortado transversalmente, com auxílio de um micrótomo automatizado (Leica, RM2255). Por fragmento foram obtidas 5 séries equidistantes de 6 cortes a 5 μm , até se atingir aproximadamente 0,5 cm do fragmento (cerca de metade). De cada série, 2 cortes foram corados com hematoxilina – eosina (H&E), segundo protocolo descrito no Anexo II, 2 cortes não corados foram analisados no programa ImageJ (versão 1.4.3.67) (Rasband, 1997) e os últimos 2 cortes guardados como reserva. As lâminas para análise no ImageJ foram desparafinadas em xilol (2x), seguido de nova passagem por xilol e montagem em DPX (Sigma®).

A determinação da área pigmentada nos cortes histológicos de pele foi realizada no programa ImageJ (Figura 9) através da análise de fotografias dos cortes (máquina fotográfica digital Olympus DP21, acoplada a um microscópio Olympus BX50, com aquisição feita com a objetiva 4x). Foi fotografado um corte de cada uma das 5 séries e determinada a percentagem de área pigmentada para cada uma delas.

Após delimitação da área correspondente à epiderme e à zona superior da derme (Figura 9A) foi realizado um corte da imagem, obtendo-se um retângulo com a área selecionada (Figura 9B). Seguidamente, o fundo exterior à área marcada foi removido, obtendo-se uma imagem apenas com a área de interesse (Figura 9C). Convertendo a

imagem num binário preto e branco o pigmento fica representado pela cor negra (Figura 9D), podendo obter-se automaticamente a percentagem de área pigmentada.

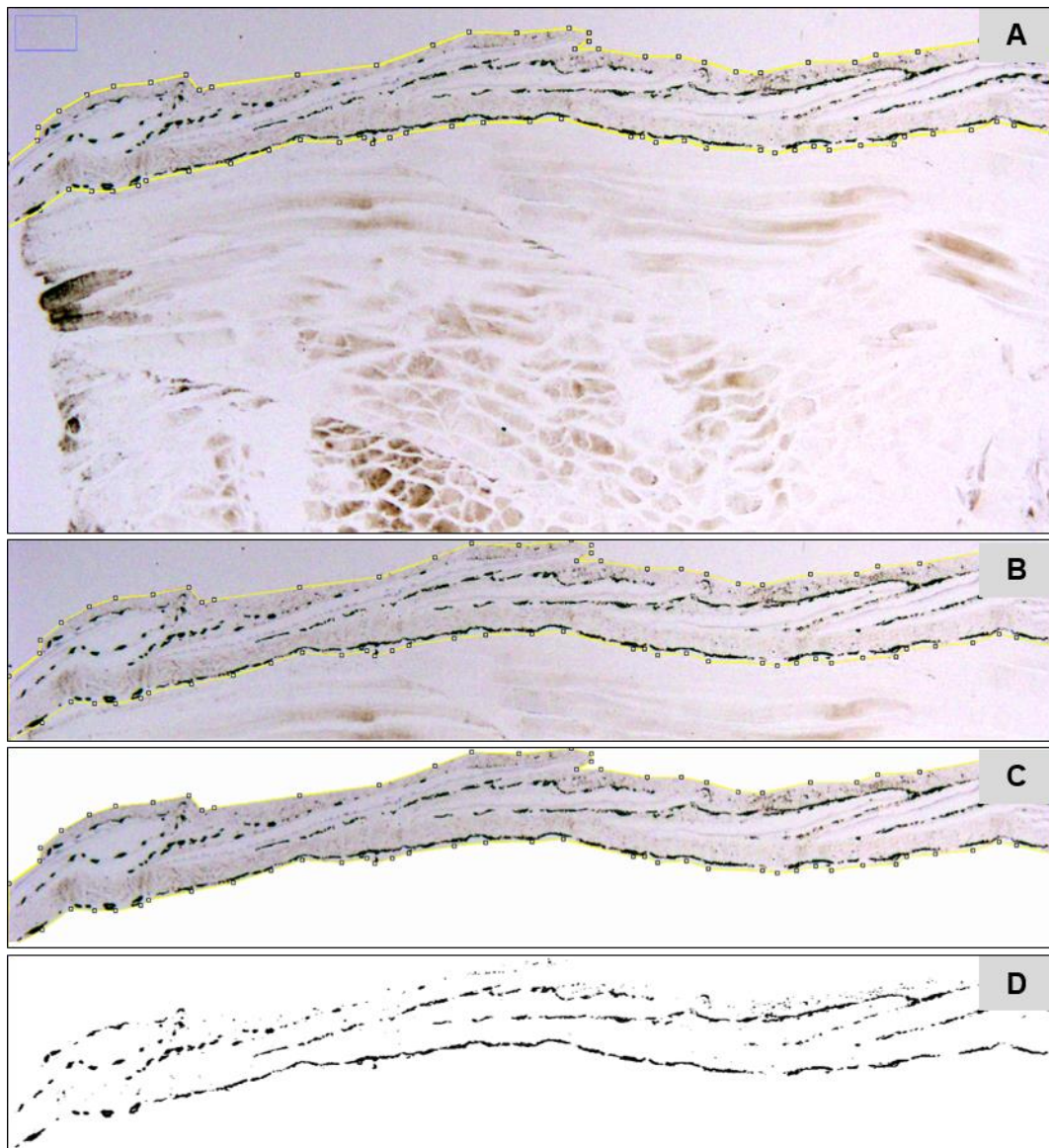


Figura 9. Determinação quantitativa da área pigmentada em imagens de cortes histológicos de pele (5 μ m). A - Delimitação da epiderme e da zona superior da derme; B - Corte da área da epiderme e da zona superior da derme selecionada e respetiva área envolvente; C - Corte da área da epiderme e da zona superior da derme sem a área envolvente; D - Binário preto e branco da imagem C.

2.7. Análise do rim anterior

2.7.1. Análise histo-morfológica do rim anterior

A análise foi realizada em cortes (5 μm) de rim anterior de truta-fário após a coloração com H&E (segundo protocolo descrito no Anexo II) e tricrómio de Masson (segundo protocolo descrito no Anexo III).

2.7.2. Determinação do cortisol por imuno-histoquímica

O procedimento da imuno-histoquímica para a marcação de cortisol foi aplicado a cortes (5 μm) de rim anterior de truta-fário e a cortes (5 μm) de suprarenal humana (controlo positivo). Os cortes utilizados foram previamente desparafinados em xilol e hidratados em uma série decrescente de etanol, seguido de água corrente e água destilada. A determinação de cortisol por imuno-histoquímica foi efetuada utilizando um anticorpo policlonal específico para cortisol indicado como sendo reativo em peixe (Antibodies-Online, ABIN1172934). Testaram-se várias diluições do anticorpo (1:10; 1:15; 1:20; 1:25; 1:30; 1:50; 1:100), incluídas no intervalo recomendado pelo fabricante (1:10 a 1:100). Foram igualmente realizados testes com e sem recuperação antigénica (tampões citrato e tris - ácido etilenodiamino tetra-acético), sendo esta última opção a recomendada pelo fabricante. Otimizou-se ainda a aplicação de diferentes cromogénios (3,3' diaminobenzidina - DAB e 3-amino-9-etilcarbazol - AEC). Em simultâneo aos diferentes testes, foram realizados sempre controlos negativos. O sistema de deteção utilizado foi o *kit Max Polymer Detection System* (NovoLink™). O protocolo utilizado seguiu os passos descritos em detalhe no Anexo IV.

2.7.3. Determinação estereológica do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais

O parâmetro estereológico volume médio ponderado pelo volume (\bar{v}_v) do núcleo das células interrenais foi determinado utilizando o método *point sampled intercept* (PSI), que é independente da forma do objeto a analisar (Gundersen e Jensen, 1985). O \bar{v}_v (μm^3) foi obtido semi-automaticamente através do programa CAST-Grid (versão 1.5, Olympus). O sistema consistiu num microscópio (Olympus, BX50), um microcator (Heidenhain, MT-12), uma platina monitorizada (Prior Scientific) e uma câmara de vídeo CCD (Sony), conectado a um computador e monitor (Sony). Primeiramente, na objetiva de 4x a área

correspondente ao tecido interrenal foi delimitada (Figura 10A) e, posteriormente, com a objetiva de 100x os campos amostrados de forma sistemática, através de movimentos graduais estabelecidos nas direções x e y. Um núcleo a ser medido deve estar situado no plano de foco e um dos pontos teste da grelha de leitura deve atingir o núcleo (Figura 10B). Em seguida, um segmento de reta é traçado de uma extremidade à outra do núcleo e medido o seu comprimento (l_0). O \bar{v}_v é obtido através da fórmula: $\bar{v}_v = \pi/3 \cdot \bar{l}_0^3$.

Um total de 6 animais (3 animais/tanque, com exceção do tanque amostrado às 12 horas) foram selecionados aleatoriamente a cada tempo de amostragem. Para cada animal analisaram-se 2 cortes (5 μ m), com espaçamento de 30 μ m, corados com H&E. Em cada um dos cortes foram amostrados aproximadamente 100 núcleos.

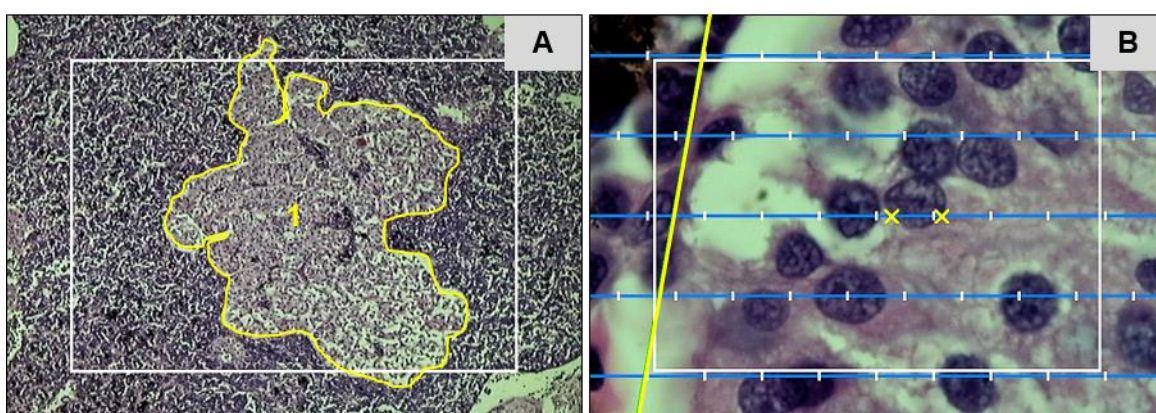


Figura 10. Determinação estereológica do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais. A - Tecido interrenal delimitado (1), numa imagem obtida com a objetiva de 4x; B - Marcação dos limites (x amarelos) de uma interseção de uma linha em um núcleo amostrado por um ponto, numa imagem obtida com a objetiva de 100x.

2.7.4. Quantificação dos níveis plasmáticos do cortisol por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Para a quantificação dos níveis plasmáticos de cortisol por ELISA foram utilizados 200 μ L de plasma de 5 a 8 animais/tempo (12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias). A seleção dos animais foi feita de modo aleatório e para os 7, 14, 28 e 42 dias, foram selecionados 2 a 4 animais de cada um dos tanques. A quantificação dos níveis de cortisol plasmáticos foi realizada através de um *kit* colorimétrico de imunoensaio enzimático por competição (Enzo®, CAT. NO.:ADI-900-071; LOT NO.:03101501C). Seguiu-se o protocolo indicado pelo fabricante (detalhado no Anexo V). Todas as análises foram feitas em duplicado e para todas as leituras foi feita uma curva de calibração, com uma série de padrões de cortisol. O *kit* tem um intervalo de leitura de 156 – 10 000 pg/mL de cortisol plasmático.

Após o período de incubação, a leitura da microplaca foi realizada num leitor de microplacas (Bio-Tek®, PowerWave™ 340) a um comprimento de onda de 405 nm.

Tal como recomendado pelo fabricante, o tratamento dos dados para o cálculo dos resultados foi efetuado recorrendo a um programa específico para imunoensaio, com um ajuste de curva que utiliza logística de 4 parâmetros (4PL) (MyAssays, 2012).

2.8. Análise estatística dos dados

Para os parâmetros físico-químicos da água foram calculadas as médias e desvios padrão correspondentes aos valores medidos entre cada uma das colheitas (1-7, 8-14, 15-28 e 29-41 dias).

No registo comportamental, os parâmetros localização, movimentação, posição vertical no tanque e coloração foi calculada a moda dos valores durante os 5 minutos de observação em cada um dos tanques. Para o parâmetro localização, os dados obtidos foram transformados em graus numéricos de 0 a 2 (grau 0 - ocupação de 1 quadrante; grau 1 - ocupação de 2 quadrantes e grau 2 - ocupação de 3 ou mais quadrantes). Para o parâmetro movimentação anormal os registos foram convertidos em graus numéricos de 0 a 1 (grau 0 - ausência de movimentação anormal e grau 1 - existência de movimentação anormal). Seguidamente foram calculadas as frequências com que cada um dos graus se verificou nos intervalos de tempo entre colheitas (1-6, 7-14, 15-28 e 29-42 dias). Para os dados da localização aplicaram-se testes de qui-quadrado tanto para a comparação de todos os intervalos de tempo, como para a comparação destes intervalos, dois a dois (Quantpsy.org, 2010). Para os restantes parâmetros, usou-se o teste de qui-quadrado, para a comparação de todos os intervalos de tempo e testes exatos de Fisher, na comparação dos intervalos de tempo, dois a dois (VassarStats, 2001). Para o parâmetro da localização foi ainda calculada a percentagem de ocupação de cada um dos quadrantes referente a cada tanque.

No registo do comportamento alimentar, para os parâmetros reação dos peixes ao alimento e ração consumida foram calculadas as frequências com que cada um dos graus se verificou nos intervalos de tempo entre colheitas (1-6, 8-12, 14-26 e 28-40 dias). No parâmetro da ração consumida foi eliminado o grau 2, uma vez que apenas se verificou uma vez. Os resultados das frequências foram utilizados em análises de testes de qui-quadrado para o parâmetro reação dos peixes ao alimento (utilizado na comparação de todos os intervalos de tempo, e na comparação dos mesmos intervalos, dois a dois), teste de qui-quadrado (para a comparação de todos os intervalos de tempo) e testes exatos de Fisher (para a comparação dos intervalos de tempo, dois a dois) para o parâmetro ração consumida.

Para o comprimento dos animais (*standard* e total), peso do animal, peso de cada um dos órgãos, fator de condição, percentagem de hematócrito, índices somáticos, parâmetros bioquímicos do sangue ou plasma, determinação qualitativa da cor da pele dos animais, percentagem de área pigmentada dos fragmentos e cortes histológicos de pele, \bar{v}_v do núcleo das células interrenais e níveis plasmáticos de cortisol os dados foram analisados recorrendo a análises de variância com um fator (*one-way* ANOVA) entre os vários tempos das colheitas, seguido de testes *post-hoc* (Tukey e Mann-Whitney U, neste caso com correção sequencial de Bonferroni) usando o software Past3 (versão 3.11) (Hammer, *et al.*, 2001). Previamente, os pressupostos estatísticos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram sempre verificados com os testes de Shapiro-Wilk W e de Levene, respetivamente. Como na maioria dos casos os dados não cumpriram os pressupostos, mesmo com transformações, adotou-se a ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis, utilizando para comparações *post-hoc* o teste Mann-Whitney U com a correção sequencial de Bonferroni. Adicionalmente, efetuou-se uma análise de variância com dois fatores (*two-way* ANOVA) entre o tempo da colheita e posição do tanque (patamar superior ou patamar inferior).

Correlações de Spearman (Socscistatistics, 2016) foram testadas entre o peso do animal e as concentrações plasmáticas de cortisol; o fator de condição e as concentrações plasmática de cortisol; o peso do animal e a glucose; o fator de condição e a glucose; o \bar{v}_v do núcleo das células interrenais e as concentrações plasmática de cortisol; a percentagem de área pigmentada dos fragmentos de pele e as concentrações plasmática de cortisol; a percentagem de área pigmentada dos cortes histológicos de pele e as concentrações plasmática de cortisol; a percentagem de área pigmentada dos fragmentos de pele e a percentagem de área pigmentada dos cortes histológicos de pele; o índice hepatossomático e o colesterol; o índice hepatossomático e os triglicerídeos e a glucose e as concentrações plasmática de cortisol. Adicionalmente foram avaliadas as regressões lineares (Statistica, versão 13.0) entre dia da colheita e as seguintes variáveis: \bar{v}_v do núcleo das células interrenais; concentrações plasmáticas de cortisol; índice hepatossomático; índice nefrossomático; fator de condição; potássio e triglicerídeos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Parâmetros físico-químicos da água

À chegada dos animais foi recolhida uma amostra de água para análise de alguns parâmetros físico-químicos, especificamente, cloro (mg/L), pH, temperatura (°C) e oxigénio dissolvido (mg/L), estando os valores obtidos indicados na Tabela 4.

Na Tabela 5 estão discriminados os valores médios dos parâmetros físico-químicos registados no decorrer do ensaio.

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos da água de transporte dos animais.

Parâmetros	Valor registado
Cloro	<0,02 mg/L
pH	6,59
Temperatura	15,00 °C
Oxigénio dissolvido	20,17 mg/L

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos (médias e desvios padrão (DP)) água dos tanques ao longo do ensaio (para valores de cloro < 0,02 mg/L considerou-se 0,019 mg/L; para as leituras de amónia não ionizada com registo << estimou-se 0,00 mg/L).

Parâmetro \ Dias	1-7		8-14		15-28		29-42	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
NH ₃ (mg/L)	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NO ₂ ⁻ (mg/L)	1,96	1,59	0,91	0,72	0,57	0,49	0,31	0,24
Cloro (mg/L)	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00
Dureza (°dgH)	7,47	1,41	6,64	0,57	6,38	0,63	5,42	0,86
pH	7,61	0,14	7,29	0,17	7,31	0,10	7,34	0,17
Temperatura (°C)	17,90	0,70	18,65	0,55	18,76	0,98	19,52	0,58
Oxigénio dissolvido (mg/L)	8,79	0,33	8,60	0,27	8,45	0,32	8,02	0,37
Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	133,78	25,23	118,79	10,16	114,11	11,34	96,96	15,43

3.2. Registo comportamental

3.2.1. Localização

Inicialmente, os peixes encontravam-se distribuídos entre 1 e 3 ou mais quadrantes, no entanto, de forma gradual passaram a ocupar um menor número de quadrantes. A partir do 7º dia, com exceção pontual do 14º dia, o número de quadrantes ocupados variou entre 1 e 2 e do 29º dia em diante a ocupação foi maioritariamente restrita a um único quadrante (Figura 11A).

Pelos testes de qui-quadrado foi possível verificar que o intervalo de tempo 1-6 dias diferiu significativamente dos restantes intervalos de colheita. O intervalo 15-28 dias foi igualmente distinto do 29-42 dias. A aplicação do teste entre os intervalos de tempo dos 7-14 dias com os 15-28 e 29-42 dias não foi possível por existirem valores de frequência inferiores a 1, correspondentes ao grau 2 (ocupação de 3 ou mais quadrantes).

O cálculo da percentagem de ocupação de cada um dos quadrantes referente a cada tanque (Tabela 6) mostra que a percentagem de ocupação de cada quadrante variou de tanque para tanque, tendo sido os quadrantes 1 e 2 os mais frequentemente ocupados.

Tabela 6. Percentagem de ocupação de cada um dos quadrantes em cada um dos tanques. A cinzento-escuro estão assinaladas as percentagens de ocupação mais elevadas correspondentes a cada tanque.

Tanque	% Ocupação do Quadrante				
	1	2	3	4	5
TI-7d	38	8	17	37	0
TI-14d	30	17	4	50	0
TI-28d	60	24	4	9	4
TI-42d	16	65	15	5	0
TII-7d	19	39	24	19	0
TII-14d	50	7	7	36	0
TII-28d	18	67	7	7	1
TII-42d	6	16	8	6	64

3.2.2. Movimentação

Ao longo do tempo verificou-se uma tendência para a maioria dos peixes se encontrarem parados, sendo este comportamento constante a partir do 13º dia do ensaio

(Figura 11B). A aplicação de testes exatos de Fisher, indica diferenças significativas entre os intervalos de tempo dos 1-6 e 15-28 dias e 1-6 e 29-42 dias.

3.2.3. Posição vertical no tanque

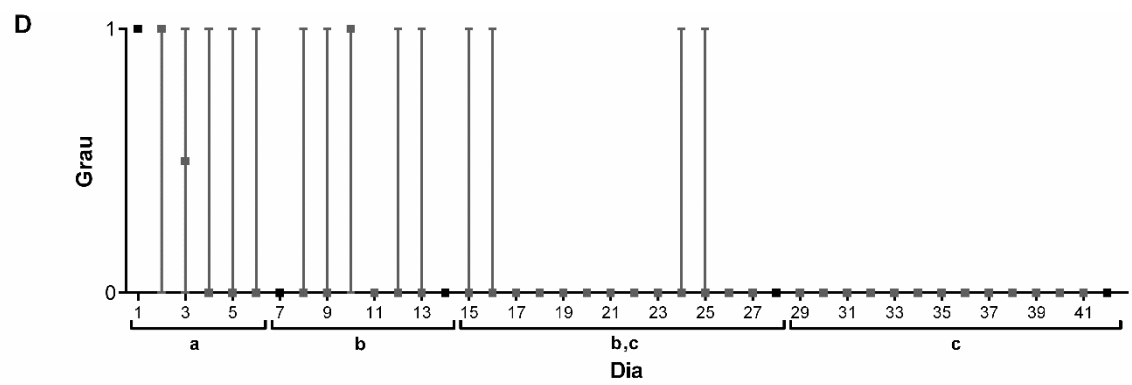
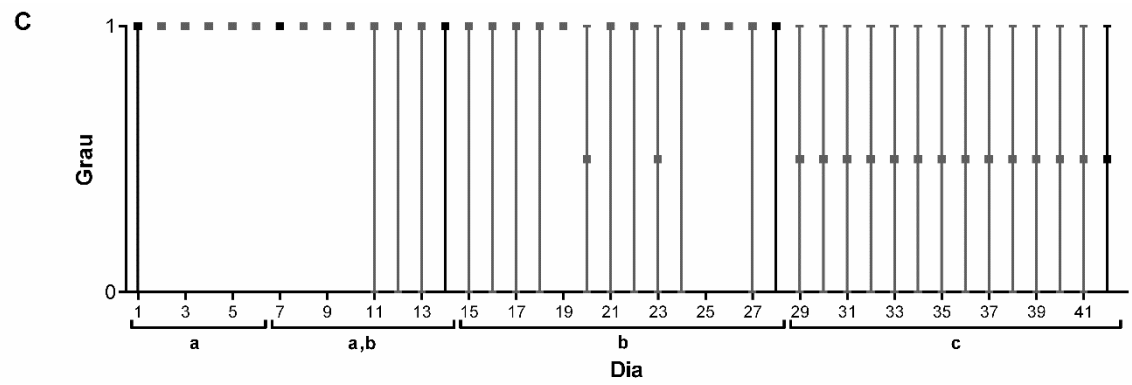
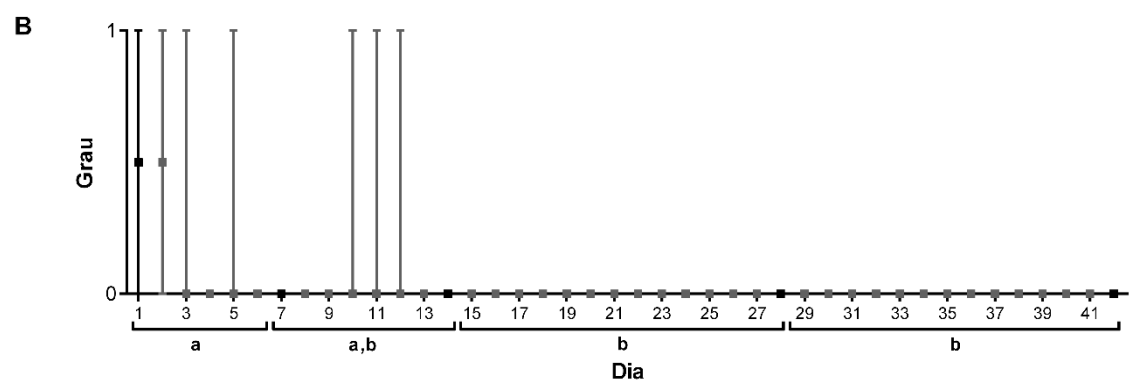
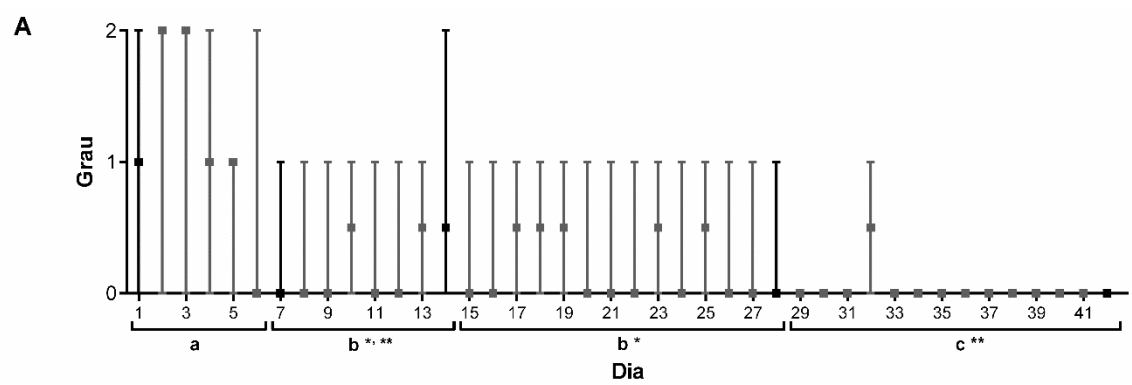
Ao longo do ensaio verificou-se uma tendência para o decréscimo do posicionamento dos animais na coluna de água (grau 1) e um aumento do posicionamento no fundo do tanque (grau 0) (Figura 11C). A comparação entre todos os intervalos de tempo, pelo teste de qui-quadrado mostrou a existência de diferenças significativas entre tempos. Testes exatos de Fisher, para a comparação dos intervalos de tempo entre colheitas, dois a dois, indicaram diferenças significativas entre os intervalos de tempo 1-6 e 15-28 dias, 1-6 e 29-42 dias, assim como entre 7-14 e 29-42 dias, e entre 15-28 e 29-42 dias.

3.2.4. Movimentação anormal

A existência de movimentações anormais (grau 1) diminuiu ao longo do tempo, tendo sido inexistente em todos os tanques a partir do 17º dia, com exceções pontuais registadas ao 24º e 25º dias (Figura 11D). A comparação realizada entre os intervalos de tempo, dois a dois (testes exatos de Fisher) mostrou a existência de diferenças significativas entre os intervalos de tempo 1-6 e 7-14 dias, 1-6 e 15-28 dias, 1-6 e 29-42 dias e ainda entre os intervalos de tempo 7-14 e 29-42 dias.

3.2.5. Coloração

Ao longo do tempo a coloração oscilou, tendo-se verificado inicialmente (até ao 5º dia) a cor média/clara (grau 1) em todos os tanques. Entre o 6º e 14 dia a mediana dos graus manteve-se no grau 1, contudo, observou-se a existência de grupos com cor escura/média (grau 2). No intervalo dos 15-42 dias, com exceção do 17º e 24º a 28º dias a mediana dos graus situou-se entre o grau 0 e 1, indicando uma tendência para o escurecimento do grupo de animais (Figura 11E). A aplicação do teste de qui-quadrado mostrou a existência de diferenças significativas entre os intervalos de tempo. Os seguintes intervalos de tempo diferiram significativamente (testes exatos de Fisher): 1-6 e 7-14 dias, 1-6 e 15-28 dias e 1-6 e 29-42 dias.



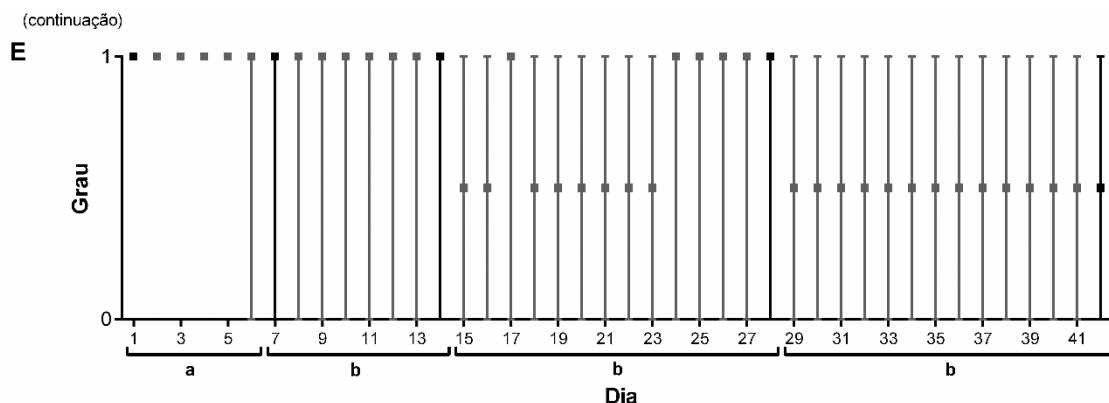


Figura 11. Parâmetros relativos ao registo comportamental ao longo dos 42 dias de ensaio. A - Localização (grau 0 - ocupação de 1 quadrante; grau 1 - ocupação de 2 quadrantes e grau 2 - ocupação de 3 ou mais quadrantes); B - Movimentação (grau 0 - parados e grau 1 - em movimento); C - Posicionamento vertical no tanque (grau 0 - fundo do tanque; grau 1 - coluna de água); D - Movimentação anormal (grau 0 - ausência de movimentação anormal; grau 1 - existência de movimentação anormal); E - Coloração (grau 0 - escura/média e grau 1 - média/clara). Os valores representados correspondem às medianas com os respetivos máximos e mínimos. Os dias das colheitas estão realçados a preto. As diferenças significativas ($p < 0,05$) existentes entre os intervalos de tempo pelos testes de qui-quadrado ou pelos testes exatos de Fisher estão assinaladas com diferentes letras na parte inferior de cada gráfico; * e ** indicam os intervalos de tempo que não foram possíveis comparar, no teste de qui-quadrado, por existirem valores de frequência inferiores a 1.

3.3. Registo comportamental alimentar

3.3.1. Tempo em que o primeiro peixe reagiu ao alimento

A tendência geral ao longo do tempo mostrou uma diminuição do tempo em que o primeiro peixe reagiu ao alimento. No primeiro dia de ensaio em nenhum dos tanques houve reação dos peixes ao alimento durante o tempo de observação, tendo a reação acontecido ao 2º dia (com um mínimo e máximo de resposta de 5,0 e 180,0 segundos, respetivamente). Entre o 2º e o 22º dia o tempo de reação variou de 0,0 e 180,0 segundos. No 24º dia, em todos os tanques ocorreu uma reação instantânea após a administração da ração (Tabela 7).

3.3.2. Reação dos peixes ao alimento

No primeiro dia de ensaio os peixes em todos os tanques analisados reagiram da mesma forma, tendo sido registado o grau 0 (mais de 50% dos peixes não reage ao alimento). Ao longo do tempo verificou-se uma alteração gradual da reação dos peixes ao alimento, verificando-se que a partir do 30º dia, em todos os tanques, mais de 50% dos peixes se movimentava continuamente ao longo do tanque em busca de alimento (grau 3) (Figura 12A).

Durante o tempo de observação o grau 1 (mais de 50% dos peixes come apenas a ração que cai à sua frente, não se movimentando para apanhar a comida) nunca se verificou, e por isso a sua frequência não foi considerada na aplicação dos testes de qui-quadrado. A comparação das frequências de cada um dos graus entre todos os intervalos de tempo mostrou a existência de diferenças significativas. A comparação dos intervalos de tempo, dois a dois, demonstrou que o intervalo de tempo 1-6 dias diferiu significativamente do intervalo 8-12 dias, 14-26 dias e do 28-40 dias. O intervalo de tempo 8-12 dias também mostrou diferenças significativas relativamente aos tempos 14-26 dias e 28-40 dias. Foi ainda indicada diferença significativa entre os intervalos de tempo 14-26 e 28-40 dias.

3.3.3. Ração consumida

Até ao 6º dia apenas foi registado o grau 0 (até 1/3 da ração foi consumida), no entanto, o consumo da ração aumentou gradualmente até ao dia 18º dia, onde 1/3 a 2/3 da ração foi consumida. Este valor manteve-se até ao dia 28º dia, tendo depois oscilando até aos 40 dias (Figura 12B).

O teste de qui-quadrado mostrou a existência de diferenças significativas entre os intervalos de tempo analisados. A análise com testes de Fisher entre os intervalos de tempo, dois a dois, mostraram que o intervalo de tempo 1-6 dias diferiu significativamente dos 8-12 dias, 14-26 dias e 28-40 dias, assim como o intervalo de tempo 8-12 dias diferiu dos 14-26 dias.

Tabela 7. Tempo (segundos) de reação ao alimento durante 5 minutos. NR - Nenhum peixe reagiu ao alimento; NA - Não foi alimentado; 0,0 segundos - Corresponde a uma reação instantânea.

Tanque	Dia	1	2	3	4	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24-40
TI-7d	NR	120,0	1,0	3,4	0,0											
TII-7d	NR	180,0	3,0	1,9	0,0											
TI-14d	NR	180,0	60,0	1,4	NA	1,1	1,3	1,0	0,6							
TII-14d	NR	5,0	1,0	1,3	NA	1,1	0,8	0,7	0,6							
TI-28d	NR	120,0	120,0	4,5	NA	2,6	2,4	0,5	0,7	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TII-28d	NR	120,0	1,0	1,6	NA	1,7	2,0	1,6	0,9	0,8	0,6	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
TI-42d	NR	120,0	2,0	2,5	NA	0,9	0,6	0,6	0,6	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TII-42d	NR	60,0	2,0	6,7	NA	1,5	0,8	11,2	1,8	3,4	2,0	1,6	0,8	0,6	0,6	0,0

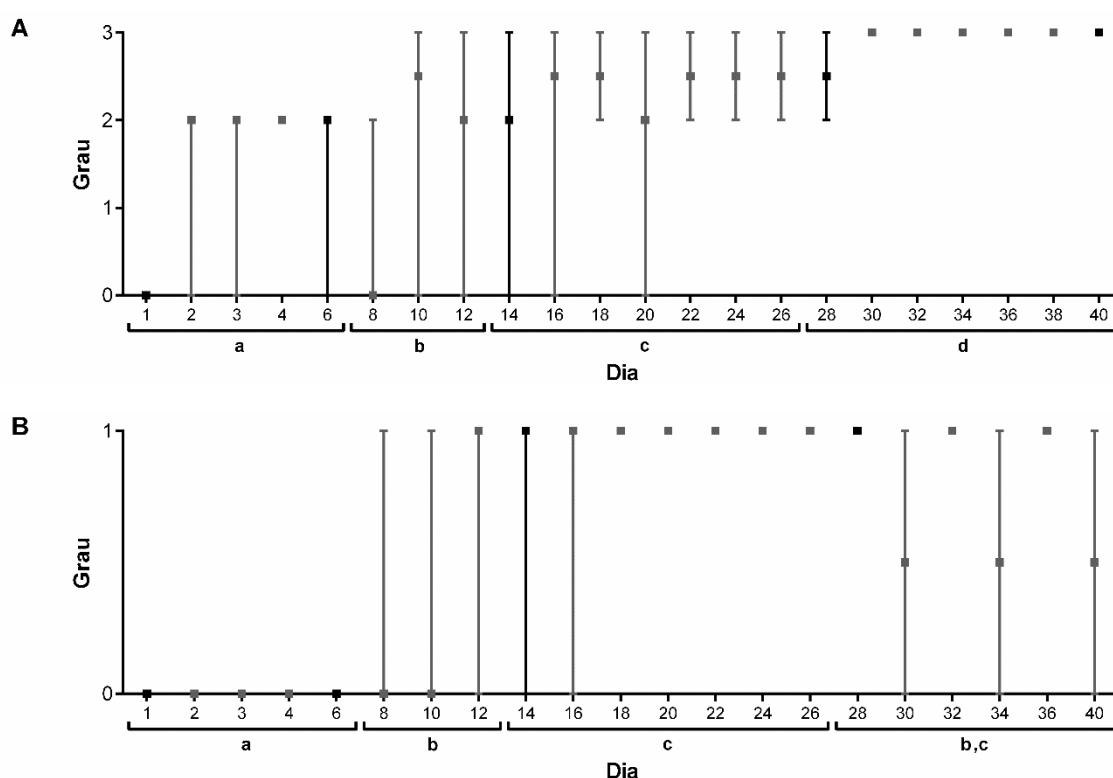


Figura 12. Parâmetros relativos ao registro comportamental alimentar ao longo dos 42 dias de ensaio. A - Reação dos peixes ao alimento (grau 0 - mais de 50% dos peixes não reage ao alimento; grau 1 - mais de 50% dos peixes come apenas a ração que cai à sua frente, não se movimentando para apanhar a comida; grau 2 - mais de 50% dos peixes movimenta-se em direção à ração, mas volta à sua posição inicial nos intervalos de captura e grau 3 - mais de 50% dos peixes movimenta-se continuamente ao longo do tanque em busca de alimento). B - Ração consumida (grau 0 - até 1/3 da ração foi consumida e grau 1 - 1/3 a 2/3 da ração foi consumida). Os valores representados correspondem às medianas com os respectivos máximos e mínimos. Os dias das colheitas estão realçados a preto. As diferenças significativas ($p < 0,05$) existentes entre os intervalos de tempo pelos testes de qui-quadrado ou pelos testes exatos de Fisher estão assinaladas com diferentes letras na parte inferior de cada gráfico.

3.4. Parâmetros biométricos

Para todos os parâmetros biométricos dos animais analisados não foram verificadas diferenças significativas entre tempos. Na Tabela I (Anexo VI) estão discriminados os mínimos, medianas e máximos, correspondentes a cada um dos parâmetros, para cada um dos tempos de amostragem.

Em relação ao peso dos animais, este apresentou valores medianos que variaram entre 38,60 e 45,67 g, com um valor máximo de 90,67 g. No comprimento total, a variação das medianas ocorreu entre 16,00 e 16,80 cm, enquanto o fator de condição atingiu valores mínimo e máximo de 0,75 e 1,35 respectivamente. As medianas do peso do fígado e rim anterior foram de 0,4379 a 0,7113 g e 0,1173 a 0,1426 g, respectivamente. Quanto aos índices hepatossomático e nefrossomático, os máximos atingidos foram de 1,57 e 0,99, respectivamente.

3.5. Análise bioquímica do sangue e plasma

Os valores das medianas do colesterol diminuíram significativamente aos 7 e 14 dias em relação ao tempo 12 horas, tendo depois aumentado aos 28 e 42 dias, razão pela qual não diferem do tempo inicial (Figura 13A).

As medianas da glucose mantiveram-se relativamente estáveis durante todo o período de ensaio, exceto ao 28º dia em que se verificou uma diminuição significativa em relação às 12 horas (Figura 13B). A análise de variância com dois fatores indicou a existência de interação entre os fatores dia e posição do tanque.

A hemoglobina mostrou uma tendência geral para aumentar ao longo do tempo de ensaio. Assim, registaram-se valores medianos de 8,79 e 8,57 g/dL aos 28 e 42 dias que diferiram dos tempos 12 horas (4,99 g/dL) e 14 dias (4,99 g/dL) (Figura 13C).

Para o potássio e os triglicerídeos não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tempos de colheita. Os valores medianos variaram entre 4,38 e 5,22 mmol/L para o potássio (Figura 13D) e entre 106,0 e 138,0 mg/dL para os triglicerídeos (Figura 13E). No potássio a análise de variância com dois fatores indicou a existência de interação entre os fatores dia e posição do tanque.

Para o hematócrito obtiveram-se valores medianos de 32 a 35%, com o registo mínimo de 27% e máximo de 42% (Tabela I, Anexo VI).

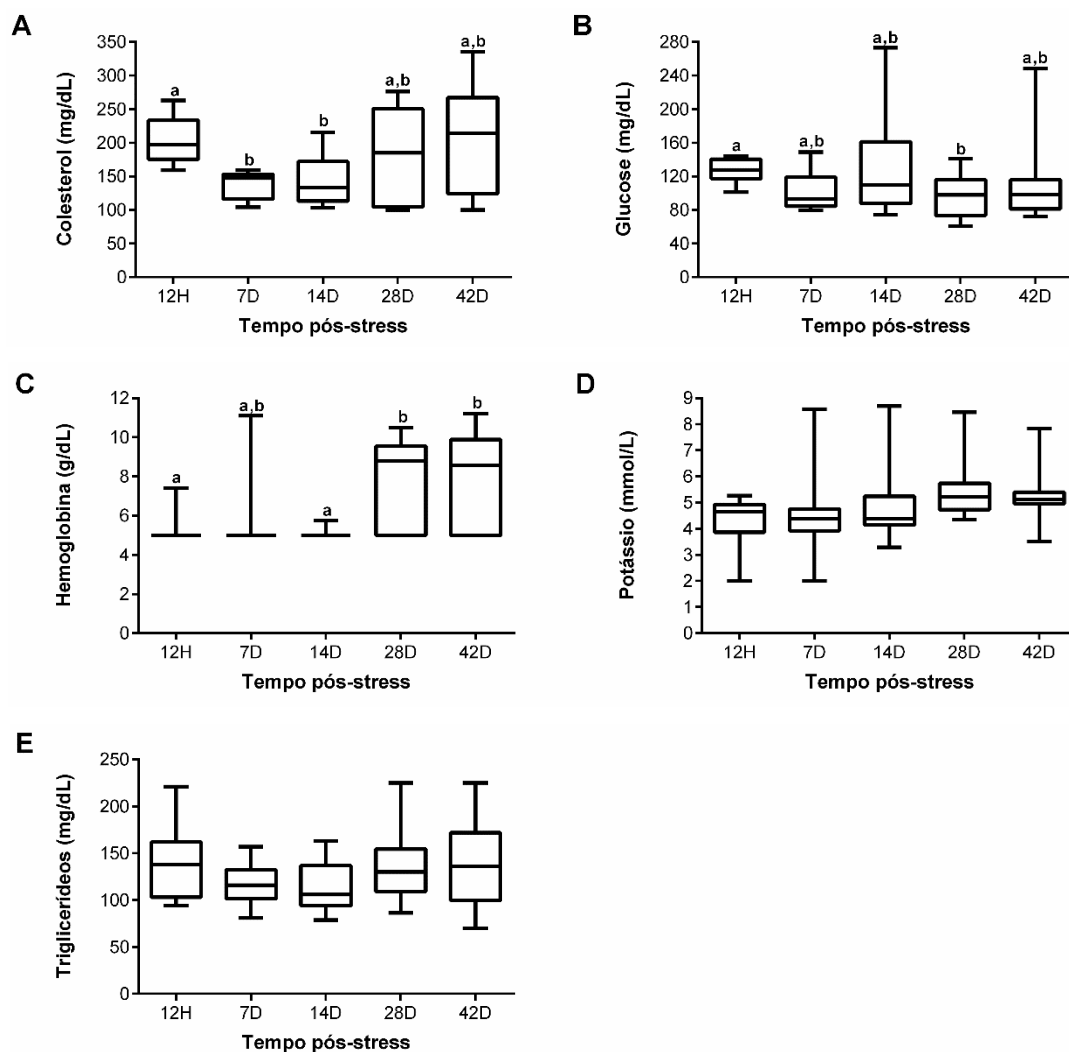


Figura 13. Parâmetros bioquímicos do sangue ou plasma ao longo dos 42 dias de ensaio. A - Colesterol (mg/dL); B - Glucose (mg/dL); C - Hemoglobina (g/dL); D - Potássio (mmol/L) e E - Triglicérides (mg/dL). Os valores representados correspondem às medianas com os respectivos máximos e mínimos em cada uma das colheitas realizadas (12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias). As diferenças significativas existentes entre os tempos de colheita estão assinaladas com diferentes letras (Mann-Whitney U com correção sequencial de Bonferroni, $p < 0,05$).

3.6. Análise da pele

3.6.1. Determinação qualitativa da cor da pele

Através da análise qualitativa da coloração da pele dos animais não foi possível demonstrar diferenças relevantes ao longo do ensaio. Aos tempos 12 horas e 42 dias os animais apresentaram uma classificação que variou entre o grau 0 (cor escura) e o grau 2 (cor intermédia clara). Ao 7º e 28º dia o grau atribuído esteve compreendido entre o 1 (cor intermédia escura) e 3 (cor clara), e no 14º dia entre o grau 0 e o grau 3 (Figura 14).

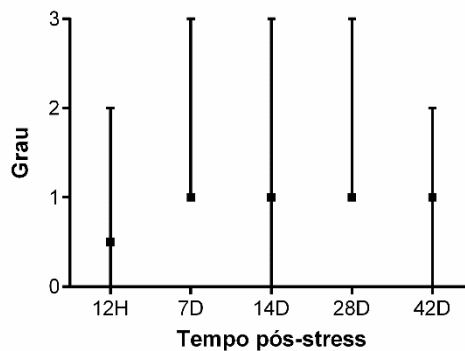


Figura 14. Análise qualitativa da coloração da pele de juvenis de truta-fário ao longo de 42 dias de ensaio. Os valores representados correspondem às medianas com os respectivos mínimos e máximos dos graus correspondentes às magnitudes de coloração da pele (grau 0 - cor escura; grau 1 - cor intermédia escura; grau 2 - cor intermédia clara e grau 3 - cor clara) dos animais, nos diferentes tempos de colheita (12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias).

3.6.2. Determinação quantitativa da área pigmentada em fragmentos de pele

A percentagem de área escura medida nos fragmentos de pele dos animais em cada um dos tempos decresceu ao longo do tempo (Figura 15A). A partir do 14^o dia ocorreu uma estabilização na área pigmentada quantificada nos animais, mantendo-se até ao final do ensaio. Assim, os tempos iniciais de colheita (12 horas e 7 dias) apresentaram uma percentagem de área escura (57,98 e 54,05%, respetivamente) significativamente superior aos restantes dias (14 - 45,70%, 28 - 43,19% e 42 - 40,53% dias).

3.6.3. Determinação quantitativa da área pigmentada em cortes histológicos de pele

A percentagem de área escura medida nos cortes histológicos da pele dos animais decresceu ao longo do tempo (Figura 15B). A estabilização da área pigmentada ocorreu a partir do 14^o dia. A primeira colheita (12 horas) apresentou uma percentagem de área escura (3,15%) significativamente superior às dos 14, 28 e 42 dias (2,05, 1,90 e 1,65%, respetivamente).

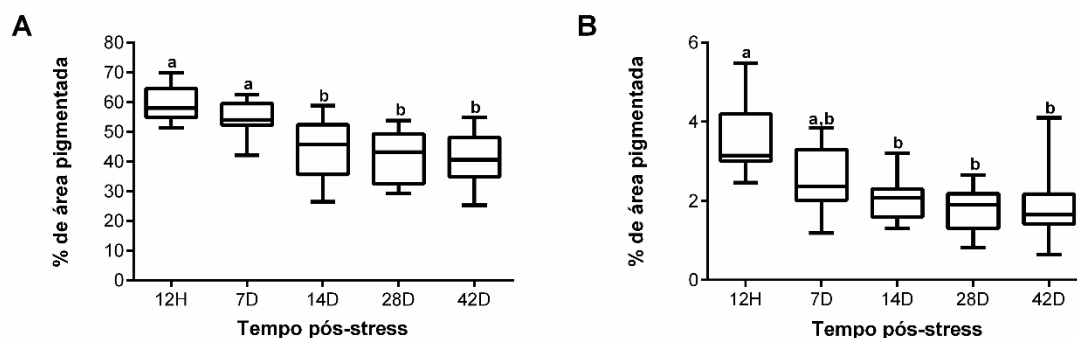


Figura 15. Percentagem de área pigmentada nos fragmentos de pele (A) e nos cortes histológicos de pele (B) de truta-fário ao longo de 42 dias de ensaio. Os valores representados correspondem às medianas com os respetivos mínimos e máximos das percentagens de área pigmentada correspondentes a cada uma das colheitas realizadas (12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias). As diferenças significativas existentes entre os tempos de colheita estão assinaladas com diferentes letras (Mann-Whitney U com correção sequencial de Bonferroni, $p < 0,05$).

3.7. Análise do rim anterior

3.7.1. Análise histo-morfológica do rim anterior

Os cortes histológicos de rim anterior (Figura 16A e B) permitiram identificar agrupamentos de células constituintes do tecido interrenal, normalmente localizado próximo a vasos sanguíneos, e extensivamente rodeado por grandes áreas de tecido hematopoiético. No seio do tecido interrenal e do tecido hematopoiético foi ainda possível verificar a existência de agregados de macrófagos, com abundante pigmento melânico (castanho escuro), também designados por centros melanomacrofágicos (Figura 16).

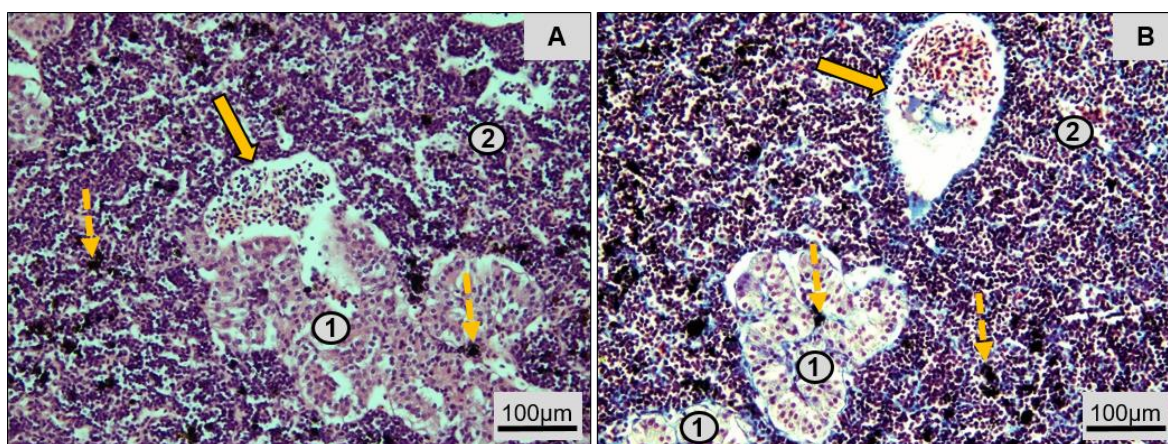


Figura 16. Imagens histológicas de rim anterior de truta-fário (A - H&E e B - Tricrómio de Masson). Tecido interrenal (1); tecido hematopoiético (2); vaso sanguíneo; centro melanomacrofágico (seta tracejada).

3.7.2. Determinação do cortisol por imuno-histoquímica

Nos testes realizados, em ambos os tecidos (suprarrenal humana e rim anterior de truta-fário), para a aferição da diluição do anticorpo a utilizar, conclui-se que diluições superiores a 1:20 não permitiam uma marcação evidente do cortisol, tanto com a utilização do cromogénio DAB, como AEC.

No controlo positivo (suprarrenal humana), verificou-se a marcação do cortisol, tanto pelo DAB (cor castanha) (Figura 17A) como pelo AEC (cor vermelha) (Figura 17C), com diluição do anticorpo 1:20. No controlo negativo (Figura 17B), não existiu marcação do cortisol pelo DAB. Na aplicação do protocolo, sem recuperação antigénica (Figura 17D), recomendada pelo fabricante, verificou-se a marcação do cortisol pelo cromogénio AEC (cor vermelha).

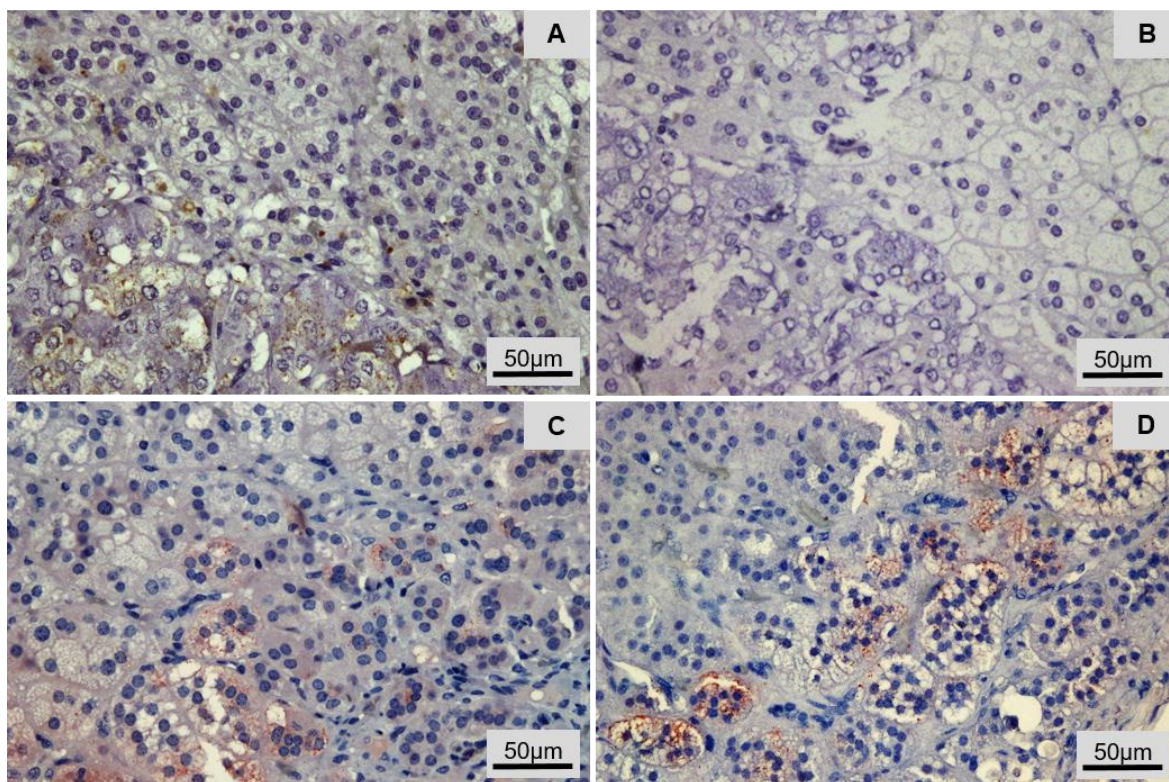


Figura 17. Determinação de cortisol por imuno-histoquímica, com aplicação de diferentes protocolos, em suprarrenal humana. A - Controlo positivo (protocolo (Anexo IV): recuperação antigénica com tampão citrato; diluição do anticorpo: 1:20; cromogénio: DAB); B - Controlo negativo do A (protocolo (Anexo IV): recuperação antigénica com tampão citrato; cromogénio: DAB); C - Controlo positivo (protocolo (Anexo IV): recuperação antigénica com tampão citrato; diluição do anticorpo: 1:20; cromogénio: AEC); D - Controlo positivo (protocolo (Anexo IV): sem recuperação antigénica; diluição do anticorpo: 1:10; cromogénio: AEC).

No rim anterior de truta-fário juvenil, a aplicação de diferentes recuperações antigénicas, nomeadamente, tampão citrato e tampão tris – EDTA mostrou diferenças na marcação obtida. Na recuperação antigénica com tampão citrato (Figura 18A) não se verificou marcação do cortisol no tecido interrenal e no tecido hematopoiético observou-se pouca marcação e muito ténue. Verificou-se ainda marcação dos glóbulos vermelhos contidos nos vasos sanguíneos. Na recuperação com tampão tris - EDTA (Figura 18B) verificou-se alguma marcação do cortisol no tecido interrenal, mas esta aconteceu maioritariamente no tecido hematopoiético. Foi ainda evidente a existência de uma forte marcação dos glóbulos vermelhos no interior dos vasos sanguíneos. No controlo negativo (Figura 18C), com a aplicação do mesmo protocolo da Figura 18A, não existiu marcação do cortisol pelo AEC. Na aplicação do protocolo recomendado pelo fabricante, sem recuperação antigénica (Figura 18D), não se verificou marcação do cortisol tanto no tecido interrenal como no tecido hematopoiético.

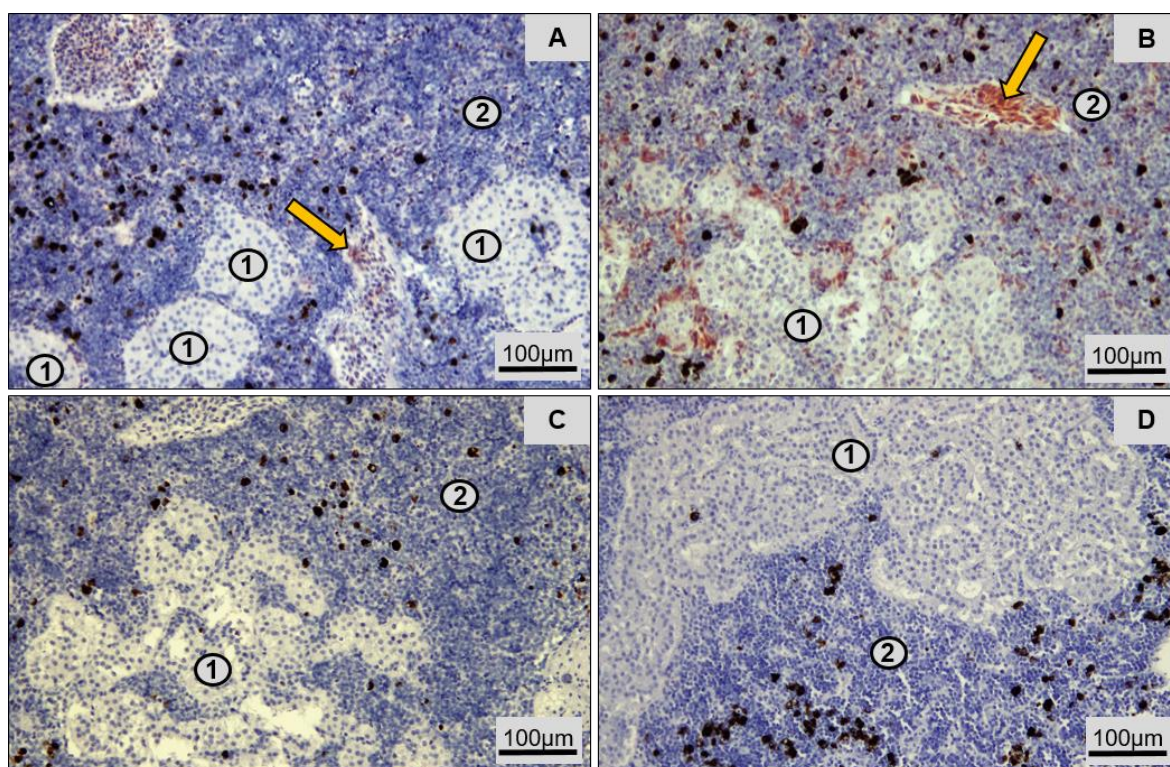


Figura 18. Determinação de cortisol por imuno-histoquímica, com aplicação de diferentes protocolos, em rim anterior de truta-fário juvenil. A - protocolo (Anexo IV): recuperação antigénica com tampão citrato; diluição do anticorpo: 1:10; cromogénio: AEC; B - protocolo (Anexo IV): recuperação antigénica com tampão EDTA; diluição do anticorpo: 1:10; cromogénio: AEC; C - negativo do A (protocolo (Anexo IV): recuperação antigénica com tampão citrato; cromogénio: AEC; D - protocolo (Anexo IV): sem recuperação antigénica; diluição do anticorpo: 1:10; cromogénio: AEC; 1 - tecido interrenal; 2 - tecido hematopoiético; setas - vasos sanguíneos.

3.7.3. Determinação estereológica do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais

Os valores medianos do \bar{v}_v do núcleo das células interrenais demonstram uma tendência geral para decrescerem ao longo do tempo, verificando-se o valor máximo às 12 horas (145,12 μm^3) e o valor mínimo aos 28 dias (96,33 μm^3) (Figura 19A).

3.7.4. Quantificação dos níveis plasmáticos do cortisol por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

A concentração plasmática de cortisol diminui ao longo do tempo, apesar de não existirem diferenças significativas entre os vários dias de colheita (Figura 19B). Registaram-se valores medianos de 21 841,9, 10 266,2, 7082,5, 3679,7 e 2162,2 pg/mL às 12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias, respetivamente. A análise de variância com dois fatores indicou a existência de interação entre os fatores dia e posição do tanque.

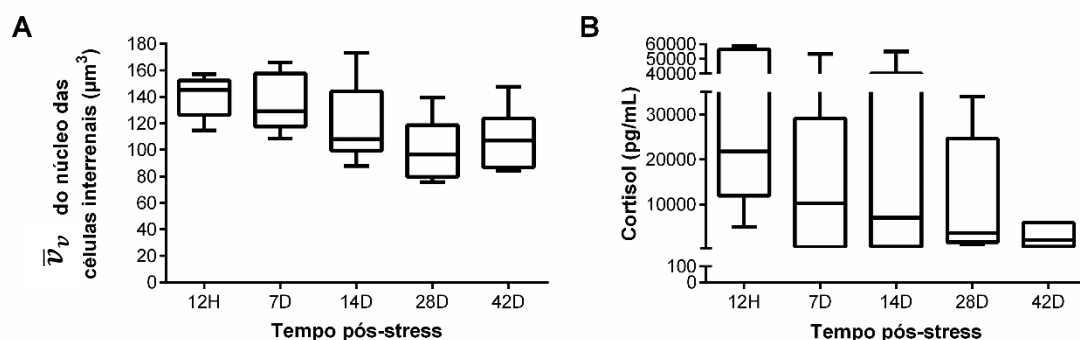


Figura 19. Volume nuclear médio ponderado pelo volume (\bar{v}_v) do núcleo das células interrenais (A) e concentração plasmática de cortisol (pg/mL) (B) de truta-fário ao longo de 42 dias de ensaio. Os valores representados correspondem às medianas com os respetivos mínimos e máximos (12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias).

3.8. Correlações e regressões lineares entre parâmetros

Verificou-se a existência de correlação linear significativa entre os seguintes parâmetros: fator de condição *versus* glucose ($R = 0,31$, $p < 0,05$); \bar{v}_v do núcleo das células interrenais *versus* concentração plasmática de cortisol ($R = 0,53$, $p < 0,05$); percentagem de área pigmentada dos fragmentos de pele *versus* concentração plasmática de cortisol ($R = 0,58$, $p < 0,001$); percentagem de área pigmentada dos fragmentos de pele *versus* percentagem de área pigmentada dos cortes histológicos de pele ($R = 0,70$, $p < 0,001$); índice hepatossomático *versus* colesterol ($R = 0,63$, $p <$

0,001); índice hepatossomático *versus* triglicerídeos ($R = 0,39$, $p < 0,01$) e glucose *versus* concentração plasmática de cortisol ($R = 0,62$, $p < 0,001$). Os dados referentes a estas análises estão descritos na Tabela II do Anexo VI.

As regressões lineares significativas ocorreram entre o dia da colheita *versus* \bar{v}_v do núcleo das células interrenais ($R = 0,51$, $p < 0,01$); concentração plasmática de cortisol ($R = 0,42$, $p < 0,05$) e potássio ($R = 0,37$, $p < 0,01$) (Tabela III do Anexo VI).

3.9. Registo da mortalidade

Ao longo dos 42 dias do ensaio registaram-se 6 mortes (especificamente aos 18, 26, 27, 36, 39 e 42 dias), 4 das quais corresponderam a animais nos quais foram detetadas perdas de equilíbrio, sem recuperação após isolamento do animal, ou lesões cutâneas graves, tendo sido efetuada a eutanásia dos mesmos com uma dose letal de anestésico.

Capítulo 4. Discussão e conclusão

O transporte dos lotes experimentais de peixes para o laboratório, antes do início dos ensaios experimentais, induz uma condição de *stress* que provoca mudanças no estado fisiológico e comportamental do animal, sendo estas verificadas durante um período subsequente que pode ser variável (Obernier e Baldwin, 2006). Por este motivo, é extremamente importante que o animal restabeleça a sua homeostasia e retome o seu estado fisiológico e comportamental, garantindo que o estudo não é enviesado pelas alterações provocadas pelo *stress* sofrido (Obernier e Baldwin, 2006). Apesar de existir uma recomendação legal para a existência de um período de aclimação dos animais utilizados em experimentação científica (UE, 2010), não existe nenhuma determinação metodológica para a avaliação do estado dos animais durante este período, de forma a garantir que os animais realmente estão aclimatados, verificando-se o seu bem-estar. Segundo vários autores, para uma correta avaliação do bem-estar animal, é necessário verificar a condição física, o estado fisiológico e comportamental dos indivíduos, não sendo nenhum destes parâmetros por si só fidedigno (Oliveira e Galhardo, 2007; Huntingford e Kadri, 2008; Ross e Ross, 2008b).

A estreita ligação que os peixes têm com o meio que os rodeia faz com que a qualidade da água tenha uma influência relevante no seu bem-estar (Huntingford e Kadri, 2008). Por este motivo, foram avaliados neste estudo vários parâmetros, tanto na água onde os peixes foram transportados, assim como nos tanques do ensaio. Os valores de pH e temperatura da água de transporte dos animais, encontravam-se dentro do intervalo recomendado para a espécie, no entanto, o oxigénio dissolvido apresentava valores bastante elevados (20,17 mg/L) tendo em conta o valor de referência (7 mg/L), o que pode acarretar efeitos nocivos, uma vez que está reportado em truta-arco-íris que a exposição a ambientes hiperóxicos induz acidose respiratória (Shabani *et al.*, 2016). Os valores médios de amónia não ionizada, pH, temperatura da água, oxigénio dissolvido e alcalinidade da água dos tanques, nos intervalos de tempo analisados (1-7, 8-14, 15-28 e 29-41 dias), encontraram-se dentro do limite recomendado, não se tendo verificado o mesmo para o nitrito. Apesar de se ter efetuado uma ativação prévia do filtro biológico, o aumento da carga orgânica existente nos tanques, devido à introdução dos animais, poderá ter feito com que a resposta do filtro biológico não fosse suficiente, verificando-se um aumento dos valores de nitrito, que tendencialmente diminuiriam com o decorrer do tempo do ensaio. Os valores de cloro detetados foram sempre inferiores a 0,02 mg/L. Pode-se então afirmar que, de um modo geral, os valores dos parâmetros da água

analisados durante a manutenção dos animais mostraram estar dentro do intervalo recomendado para a espécie, não interferindo no bem-estar dos animais.

Relativamente aos parâmetros comportamentais analisados, verificou-se que a localização dos animais demonstrou uma tendência para uma ocupação de um menor número de quadrantes ao longo do tempo, tendo a percentagem de ocupação de cada um deles variado entre tanques, sendo os quadrantes 1 e 2 os mais frequentemente ocupados, o que poderá dever-se ao facto de serem os quadrantes mais distantes da zona passível de apresentar maior interferência humana. A movimentação revelou que a maioria dos animais apresenta uma tendência para estarem parados, à medida que o tempo pós-*stress* aumenta. Em trutas-arco-íris, sujeitas a um episódio de *stress* agudo (transporte: 3 horas e 20 minutos), após o transporte, foi observada uma natação calma e uma distribuição uniforme nos tanques, tendo este padrão sido alterado após 24 horas, verificando-se uma aproximação dos animais que passaram a estar posicionados perto do fundo do tanque realizando natação apenas esporadicamente (Shabani *et al.*, 2016). Existem, portanto, semelhanças entre os padrões de comportamento das duas espécies, no entanto, a truta-fário parece precisar de tempos mais prolongados para adaptação. Num estudo sobre a hierarquia em trutas-fário foi demonstrado que os peixes dominantes, por norma, se localizavam numa posição mais próxima da fonte de alimento e gastavam mais tempo a nadar na coluna de água, comparativamente aos indivíduos submissos (Sloman *et al.*, 2000). No presente estudo, este tipo de comportamento hierárquico foi notório num dos tanques (TII-42d), no qual um peixe dominante não estava pousado no fundo e nadava sobre o resto do grupo.

As movimentações anormais detetadas consistiram na verificação de alterações repentinas na velocidade de natação e mudanças de trajetória rápidas, assim como na verificação de uma posição corporal vertical, ficando o animal apenas com a zona posterior do corpo dentro de água enquanto nadava sobre a coluna de água ou contra a parede do tanque. No geral, após o 17º dia, este comportamento não ocorreu, denotando que os animais se encontravam em processo de aclimação aos sistemas de manutenção. O perfil de natação ativa contra as paredes e comportamentos de fuga também foram observados em salmão-do-Atlântico, durante um episódio de *stress* agudo (confinamento) (Kittilsen *et al.*, 2009a), e essa elevada atividade locomotora encontra-se associada à elevada libertação de cortisol (Kittilsen *et al.*, 2009a; Kittilsen *et al.*, 2009b). Estes dados corroboram o facto de neste ensaio a inexistência de movimentações anormais coincidir com o intervalo de tempo no qual os animais terão atingido níveis basais de cortisol (entre os 14º e 28º dia), como se discutirá de seguida.

O escurecimento da pele de peixe tem sido referido como um indicador secundário de *stress* (Iger *et al.*, 1995). A análise qualitativa da coloração da maioria dos animais de

cada tanque mostrou que nos primeiros 5 dias os peixes apresentavam maioritariamente uma coloração média/clara, contrastando com a do restante tempo do ensaio, que foi uma coloração média/clara e escura/média, sendo que era expectável um decréscimo pelo menos próximo aos 42 dias. Estes resultados qualitativos podem eventualmente ter sido enviesados pela distribuição e pela atividade dos animais no tanque. A proximidade dos animais devido à ocupação de um menor número de quadrantes e a diminuição da sua atividade poderão ter criado uma sensação visual de que a maioria dos animais estaria com uma coloração mais escura. Em aparente contradição com os anteriores, os resultados das determinações quantitativas da área pigmentada em fragmentos de pele e em cortes histológicos de pele demonstram que os animais, ao longo do tempo, apresentavam uma percentagem de área pigmentada menor. Assim sendo, a análise quantitativa da pele surge como um excelente parâmetro a utilizar na avaliação do nível de *stress* dos animais. Interligando os resultados obtidos com a análise comportamental, concluiu-se que existiu uma estabilização geral dos comportamentos a partir do 17º dia.

A inibição do apetite é bastante comum em salmonídeos sujeitos a *stress* (Kittilsen *et al.*, 2009a), contudo neste estudo a ausência de alimentação em todos os tanques apenas se observou no primeiro dia. No entanto, até ao 6º dia a ingestão de alimento foi reduzida (até 1/3 da ração) em todos os tanques, o que já tinha sido relatado em animais da mesma espécie sujeitos a um episódio de *stress* agudo (manipulação + confinamento), em que ocorreu um decréscimo na ingestão nos três dias pós-*stress* (Pickering *et al.*, 1982). Os diferentes tempos em que se verificou a redução acentuada de alimento, podem estar relacionados com o grau de resposta ao *stress*, uma vez que os animais sujeitos ao referido confinamento, durante 2 minutos, 6 horas pós-*stress* apresentavam níveis plasmáticos médios de cortisol de 20 000 pg/mL, e os animais deste ensaio, 12 horas pós-*stress*, ainda apresentavam 30 482,1 pg/mL. Pressupõe-se que o tempo de recuperação dos animais deste ensaio seja superior comparativamente aos animais utilizados por Pickering e os seus colaboradores. Neste estudo verificou-se ainda uma tendência ao longo do tempo para uma diminuição do tempo de reação ao alimento. Na maioria dos casos, a partir do 16º dia, com exceção do tanque TII-28d e TII-42d, os animais reagiram de forma instantânea ao alimento. Possivelmente a resposta mais tardia nos tanques referidos (20º dia e 24º dia, respetivamente), poderá estar relacionada com a existência de um animal dominante ou com a tentativa de dominância, tendo-se observado agressões por parte do animal dominante quando os outros animais tentavam alimentar-se. A reação dos peixes ao alimento mostrou uma alteração gradual ao longo do tempo, pelo que entre o 16º e o 28º dia, com exceção do 20º dia, a mediana dos graus verificados nos tanques se situou entre o grau 2 (mais de 50% dos peixes movimenta-se em direção à ração, mas volta à sua posição inicial nos intervalos de captura) e o grau 3

(mais de 50% dos peixes movimentam-se continuamente ao longo do tanque em busca de alimento). A partir do 30º dia, em todos os tanques a maioria dos peixes movimentou-se continuamente em busca de alimento. Mais uma vez, a existência de animais dominantes, ou a tentativa de dominância, parece ter influência no comportamento dos animais. A quantidade de ração consumida pelos animais também mostrou um aumento gradual ao longo do tempo. Num estudo de hierarquia em trutas-fário, verificou-se que os animais subordinados ingeriam uma menor quantidade de alimento comparativamente ao animal dominante (Sloman *et al.*, 2000), o que poderá justificar os consumos de ração mais baixos observados no presente estudo nos tanques II dos 28 e 42 dias.

Excluindo as alterações comportamentais alimentares que possivelmente estariam relacionadas com a presença de indivíduos dominantes, podemos assumir que existiu uma estabilização geral do comportamento alimentar a partir do 16º dia.

Tendo em conta os resultados biométricos obtidos, pode afirmar-se que apesar dos animais não se terem alimentado no 1º dia e a ingestão de ração até ao 6º dia ter correspondido ao grau mais baixo em todos os tanques, não foi suficiente para diminuir a relação existente entre o peso e o comprimento dos animais, uma vez que o valor mediano do fator de condição de 1,3 se manteve estável até ao 14º dia.

Tal como em outros vertebrados, nos peixes o fígado tem uma função muito importante a nível fisiológico e metabólico, tanto a nível anabólico como catabólico. O valor do índice hepatossomático está correlacionado com a quantidade de lípidos armazenados, sendo que nos peixes ósseos é cerca de 1-2%, sendo afetado pela alimentação, reprodução e *stress* (Bruslé e Anadon, 1996). Os valores obtidos para cada um dos tempos de colheita estão dentro do limite indicado. Apesar de não terem sido detetadas diferenças significativas, ao 7º e 14º dias, os valores são sugestivamente mais baixos quando comparados aos das 12 horas, o que poderá estar relacionado com o baixo consumo de ração que ocorreu até ao 10º dia, e pela mobilização dos lípidos na tentativa de compensar o gasto energético suplementar existente na resposta ao *stress* (Tocher e Glencross, 2015), o que é sustentado pela verificação de uma correlação linear positiva com os valores sanguíneos de colesterol ($R = 0,63$, $p < 0,001$) e triglicerídeos ($R = 0,39$, $p < 0,01$), os quais diminuíram até ao 14º dia. Aos 42 dias, ocorreu uma nova descida dos valores do índice hepatossomático, mas pensa-se que esteja relacionada com a existência de um animal dominante no tanque II. Douradas (*Sparus aurata*) juvenis, sujeitas a altas densidades de manutenção, durante 15 semanas, apresentaram valores mais baixos de índice hepatossomático, colesterol e triglicerídeos, comparativamente com os animais mantidos a baixas densidades (Montero *et al.*, 1999). Em trutas-arco-íris juvenis, sujeitas a *stress* crónico, pela ingestão diária de cortisol, durante 10 semanas, o fator de condição e o índice hepatossomático foram

significativamente mais baixos em comparação com o grupo controlo (Barton *et al.*, 1987).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos, assim como a determinação dos níveis plasmáticos de cortisol permitiram avaliar alterações fisiológicas correspondentes à resposta primária e secundária ao *stress*. A avaliação da ativação do eixo HPI, envolvida na resposta primária ao *stress*, realizou-se a partir da medição da concentração plasmática de cortisol, não se tendo verificado diferenças significativas entre os diferentes tempos de colheita. No entanto, a regressão linear entre este parâmetro e o dia da colheita foi significativa e negativa ($R = 0,42$, $p < 0,05$). Com o decorrer do tempo pós-*stress*, a concentração plasmática de cortisol diminuiu. O aumento da concentração de cortisol após o episódio de *stress* verifica-se num período inferior a 1 hora (Ross e Ross, 2008a), sendo possível registar um aumento acentuado dos níveis plasmáticos, em diferentes espécies de peixes, sujeitas a transporte de curta duração (< 8 horas) (Sampaio e Freire, 2016). Em animais juvenis de três espécies de truta — truta-arco-íris, truta-de-lago (*Salvelinus namaycush*) e truta-das-fontes (*Salvelinus fontinalis*) — submetidas a um transporte com duração de duas horas, semelhante ao tempo de transporte dos animais utilizados neste ensaio, foi observado um pico de cortisol 3 horas pós-*stress* (Barton, 2000). Assim sendo, o valor mediano máximo de cortisol obtido neste ensaio (21 841,9 pg/mL) às 12 horas pós-*stress*, poderá não corresponder ao pico de cortisol, que possivelmente terá ocorrido num período de tempo inferior. Para salmonídeos, os valores de cortisol em repouso são inferiores a 10 000 pg/mL (Iwama, 1998), no entanto, Pickering e Pottinger (1989) encontraram em trutas-fário juvenis níveis basais de cortisol plasmático sempre inferiores a 5000 pg/mL, e Barton (2000) reportou concentrações de repouso de aproximadamente 1000 pg/mL. Em trutas-fário imaturas, com mais de um ano de idade, registaram-se níveis basais compreendidos entre 1000 e 4000 pg/mL (Pickering e Pottinger, 1985). De acordo com os dados de Iwama (1998) e de Pickering e Pottinger (1989), os animais utilizados neste ensaio atingiram níveis basais medianos de cortisol plasmático entre o 14º e 28º dias, concluindo-se que dentro deste intervalo de tempo os animais deixaram de estar *stressados*. No entanto, os níveis medianos de cortisol, ao longo dos 42 dias foram superiores aos níveis basais detetados por Barton (2000).

Os valores medianos de glucose foram relativamente estáveis ao longo do tempo do ensaio variando entre 93,4 e 128 mg/mL, sendo que apenas ao 28º dia ocorreu uma diminuição significativa comparativamente às 12 horas. A glucose sanguínea provém da alimentação, da glicogenólise e da gluconeogénese (Silveira *et al.*, 2009), sendo que, na resposta secundária ao *stress*, está descrito um aumento da glucose sanguínea, provocado pela glicogenólise e pela gluconeogénese, induzidas pelas catecolaminas e

pelo cortisol, respetivamente (Eslamloo *et al.*, 2014; Sampaio e Freire, 2016). Em juvenis de truta transportados durante duas horas, semelhante ao tempo de transporte dos animais neste ensaio, os picos de glucose aconteceram 3 ou 6 horas pós-*stress*, tendo os valores diminuído gradualmente até às 48 horas, sendo que em truta-arco-íris, 12 horas depois do *stress*, os valores de glucose eram próximos aos verificados antes da indução do *stress* (Barton, 2000). Iwama (1998) refere que, em salmonídeos, os valores de glucose em repouso são inferiores a 72 mg/dL, e em *stress* superiores a 90 mg/dL. Contudo, em juvenis de truta-fário, registaram-se níveis de repouso de 86,6 mg/dL (Ruane *et al.*, 1999) e de 100 mg/dL (Barton, 2000) e, em adultos da mesma espécie, com mais de 2 anos, valores aproximados de 80 e 110 mg/dL (Pickering *et al.*, 1982). Neste ensaio, entre as 12 horas e os 7 dias, observou-se uma diminuição dos valores medianos da glucose (128 mg/dL e 93,4 mg/dL, respetivamente). Tendo em conta os resultados obtidos por Barton (2000), e os valores repouso de glucose que obteve para trutas-fário juvenis, prevê-se que o pico de glucose provocado pela glicogenólise e pela gluconeogénese, tenha acontecido num período de tempo bastante inferior a 12 horas, correspondendo o valor obtido neste tempo, ao decréscimo de glucose na retoma dos valores basais da espécie, estando às 12 horas bastante próximos do valor basal de 100 mg/dL referido por Barton (2000). Dos 14 aos 42 dias, os valores medianos da glucose foram superiores aos detetados ao 7º dia, estando este aumento possivelmente relacionado com a alimentação dos animais, uma vez que neste período de tempo os animais aumentaram o consumo de ração. Foi verificada a correlação linear e positiva entre os níveis de glucose e o fator de condição ($R = 0,31$, $p < 0,05$), assim como entre os níveis de glucose e a concentração plasmática de cortisol ($R = 0,62$; $p < 0,001$). A segunda correlação linear sugere a existência de gluconeogénese, induzida pelo cortisol. Analisando os resultados obtidos, a glucose demonstrou ser um bom parâmetro a utilizar na avaliação do *stress* dos animais, sendo que parece ser mais útil na verificação da alimentação dos animais, do que na verificação de *stress* secundário, uma vez que as alterações provocadas pela glicogenólise e pela gluconeogénese se verificam num espaço de tempo muito curto, retomando aos níveis basais num período aproximado de 12 horas, quando os níveis de cortisol ainda indicam um estado de *stress* por parte dos animais.

Durante a resposta ao *stress* é referida a existência de mobilização dos lípidos na tentativa de compensar o gasto energético suplementar (Tocher e Glencross, 2015), o que se verificou na análise das medianas do colesterol e triglicerídeos sanguíneos, tendo o valor de ambos diminuído aos 7º e 14º dias, de forma significativa no colesterol, comparativamente com o tempo inicial (12 horas), aumentando posteriormente, de forma gradual, até ao 42º dia. Analisando o padrão de resposta do colesterol e dos

triglicerídeos, neste ensaio, prevê-se que entre o 14º e o 28º dia os animais deixaram de estar sob efeito do *stress*, tendo a mobilização lipídica cessado, verificando-se um aumento destes lípidos na corrente sanguínea dos animais. Os valores atingidos aos 42 dias pós-stress encontram-se dentro dos intervalos reportados para truta (Kenari *et al.*, 2013).

Para os valores de potássio não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tempos de colheita, mas a regressão linear com o dia da colheita foi significativa e positiva ($R = 0,37$, $p < 0,01$), verificando-se uma tendência para o aumento do seu valor com o decorrer do tempo. Na literatura é referido que os valores plasmáticos de potássio decrescem em consequência da resposta secundária ao *stress*, o que se confirmou em trutas-arco-íris juvenis sujeitas a transporte (3 horas e 20 minutos). De facto, 24 e 48 horas após o episódio de *stress* os valores médios de potássio detetados (4,4 mmol/L e 3,2 mmol/L, respetivamente) foram inferiores aos valores verificados antes e logo após ao episódio de *stress* (4,9 mmol/L e 5,0 mmol/L, respetivamente), contudo estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Shabani *et al.*, 2016). No entanto, em trutas-fário sujeitas a diferentes tempos de confinamento foram reportados valores de potássio significativamente mais elevados comparativamente ao grupo controlo (Ruane *et al.*, 1999). Ao longo deste ensaio ocorreu um aumento dos níveis de potássio até ao 28º dia, sugerindo a ocorrência de uma diminuição dos níveis de potássio na fase inicial de resposta ao *stress*, tal como aconteceu em trutas-arco-íris (Shabani *et al.*, 2016).

O hematócrito e a hemoglobina fazem parte dos marcadores hematológicos mais utilizados na avaliação da condição de *stress* em peixes, sendo que a elevação dos valores de ambos demonstra um aumento da capacidade de transporte de oxigénio no sangue, em resposta a uma maior exigência metabólica provocada pelo *stress*. No entanto, é frequente não apresentarem alterações, mesmo quando os valores de cortisol indicam a ativação da resposta ao *stress* (Sampaio e Freire, 2016). Neste ensaio os valores medianos de ambos os parâmetros mantiveram-se estáveis até ao 14º dia (32% e 4,99 g/dL, respetivamente), tendo-se verificado ao 28º e 42º dia valores mais elevados. Em trutas-fário juvenis está descrito um valor médio do hematócrito do grupo controlo de 34,2%, tendo este aumentado significativamente para 41,9% e 40,8% quando os animais foram sujeitos a um confinamento de 1 hora e 30 minutos e de 5 horas e 30 minutos, respetivamente (Ruane *et al.*, 1999). Comparando os valores medianos de hematócrito obtidos neste ensaio com os valores do grupo controlo de Ruane (1999), observa-se que estes se encontram próximos, sugerindo que não houve alterações neste parâmetro relacionadas com a resposta ao *stress*. Os valores de hemoglobina atingidos aos 28 dias pós-stress encontram-se dentro dos intervalos reportados para truta (Kenari *et al.*, 2013).

Nas análises da pele, os resultados obtidos na determinação qualitativa da cor da pele dos animais não mostraram coerência total com as determinações quantitativas, o que se pensa que esteja relacionado com a dificuldade verificada na atribuição dos graus qualitativos. As determinações quantitativas das áreas pigmentadas, em fragmentos de pele e em cortes histológicos de pele, mostraram coerência nos seus resultados, existindo uma correlação linear e positiva entre os dois parâmetros ($R = 0,70$, $p < 0,001$). Em ambos os casos, ocorreu uma tendência para a diminuição da percentagem de área pigmentada quantificada, com uma estabilização a partir do 14º dia. No entanto, as diferenças significativas encontradas entre tempos foram distintas, o que poderá estar relacionada com o facto de a determinação quantitativa da área pigmentada em fragmentos de pele ter sido realizada avaliando apenas a parte superior da epiderme, enquanto a determinação quantitativa da área pigmentada em cortes histológicos de pele analisou a epiderme e a zona superior da derme, permitindo medir com maior detalhe o pigmento existente nas zonas mais inferiores. A percentagem da área pigmentada dos fragmentos de pele e as concentrações plasmáticas de cortisol apresentaram uma correlação linear positiva ($R = 0,58$, $p < 0,001$).

A imuno-histoquímica em cortes de rim-anterior não mostrou resultados fiáveis, uma vez que a marcação de cortisol ocorreu principalmente no tecido hematopoiético, e nos glóbulos vermelhos, sendo muito ténue no tecido interrenal.

Na literatura está descrito que o *stress* crónico ou o tratamento com ACTH provoca hiperplasia e hipertrofia do tecido interrenal de peixes teleósteos. Tendo como base esta informação, foi avaliado o tecido interrenal de trutas-fário selvagens sujeitas a três tipos de ambientes: limpo, poluído e densamente poluído, com o objetivo de verificar *stress* crónico. O diâmetro e a área ocupada pelos núcleos interrenais aumentaram com o acentuar da poluição (Norris *et al.*, 1997). No presente estudo, os valores medianos do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais não foram significativamente diferentes entre os vários tempos de colheita, mas a regressão linear entre este parâmetro e o dia da colheita foi significativa e negativa ($R = 0,51$, $p < 0,01$). Ao longo do tempo, verificou-se uma tendência geral para o seu decréscimo, tendo o valor mínimo ocorrido aos 28 dias. Apesar de ter aumentado aos 42 dias, o valor foi inferior ao verificado ao 14º dia, considerando-se que a partir do 14º dia houve uma estabilização deste parâmetro. O volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais apresentou uma correlação linear positiva com as concentrações plasmáticas de cortisol ($R = 0,53$, $p < 0,05$), o que reitera o facto de o tecido interrenal, localizado no rim anterior, promover a síntese e libertação de cortisol no caso dos peixes teleósteos (Ross e Ross, 2008a). Em cará (*Cichlasoma dimerus*), também se observou uma correlação positiva (pelo coeficiente de Pearson) entre os

níveis de cortisol e a área nuclear das células esteroideogênicas (responsáveis pela produção de cortisol nos peixes teleósteos) (Morandini *et al.*, 2014).

Finalizando, atendendo à análise multiparamétrica descrita, conclui-se que existiu uma estabilização da condição física, do estado fisiológico e comportamental dos animais entre o 14º e 28º dia, recomendando-se um período de aclimação mínimo de 28 dias, de forma a garantir, ou pelo menos maximizar, os níveis basais em repouso para a espécie. De todos os parâmetros avaliados, os mais promissores que poderão funcionar como alvos de avaliação em estudos que se pretendam monitorizar o processo de aclimação de juvenis de truta-fário, e eventualmente de outras espécies de peixes, são os seguintes parâmetros: comportamentais (localização dos animais no tanque, movimentação dos peixes, posição vertical dos peixes no tanque, existência de movimentações anormais), perfil alimentar (análise do tempo em que o primeiro peixe reagiu ao alimento, reação dos animais ao alimento e quantidade de ração consumida), condição física (fator de condição) e a bioquímica sanguínea (colesterol, triglicerídeos e glucose), assim como a avaliação quantitativa das áreas pigmentadas dos fragmentos de pele, a análise estereológica do volume nuclear médio ponderado pelo volume do núcleo das células interrenais e a quantificação dos níveis plasmáticos do cortisol. Há que ressaltar que alguns dos parâmetros são “invasivos” em relação ao organismo, podendo implicar o sacrifício do peixe, e serão úteis essencialmente em estudos científicos sobre o processo de aclimação ou em situações em que possa haver lugar a amostragem de um grupo de peixes que será posteriormente utilizado para fins experimentais ou outros. A avaliação da condição física e do estado fisiológico e comportamental dos animais mostrou ser extremamente necessária, verificando-se que existe relação entre diferentes parâmetros analisados, que em conjunto permitem uma correta interpretação do nível de *stress* dos indivíduos. Adicionalmente, sugere-se que sempre que sejam verificados comportamentos de excessiva dominância ou tentativa de dominância por parte de algum animal, este seja retirado do tanque durante o período de aclimação, uma vez que interfere e atrasa a recuperação (nomeadamente após transporte) dos restantes animais.

Referências

- Acerete, L., Balasch, J. C., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L. (2004). Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* 237: 167-178.
- Ahmad, S. M., Shah, F. A., Bhat, F. A., Bhat, J. I. A., Balkhi, M. H. (2011). Thermal adaptability and disease association in common carp (*Cyprinus carpio communis*) acclimated to different (four) temperatures. *Journal of Thermal Biology* 36: 492-497.
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104: 199-235.
- Bagnara, J. T., Matsumoto, J. (2006). Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. Em: *The pigmentary system: Physiology and pathophysiology*. 2 (ed), Nordlund, J. J., Boissy, R. E., Hearing, V. J., King, R. A., Oetting, W. S., Ortonne, JP. (eds), Blackwell Publishing Ltd, pp. 11-59.
- Barton, B. A., Schreck, C. B., Barton, L. D. (1987). Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 173-185.
- Barton, B. A. (2000). Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North American Journal of Aquaculture* 62: 12-18.
- Bruslé, J., Anadon, G. G. (1996). The structure and function of fish liver. Em: *Fish Morphology*. 1 (ed), Munshi, J. S. D., Dutta, H. M. (eds), CRC Press, pp. 77-96.
- Carenzi, C., Verga, M. (2009). Animal welfare: Review of the scientific concept and definition. *Italian Journal of Animal Science* 8: 21-30.
- Castro, A., Becerra, M., Manso, M. J., Anadón, R. (1999). Development of immunoreactivity to neuropeptide Y in the brain of brown trout (*Salmo trutta fario*). *The Journal of Comparative Neurology* 414: 13-32.
- Costa, J. L., Madureira, T. V., Malhão, F., Lopes, C., Gonçalves, J. F., Rocha, E. (2016). How to assess expeditiously the skin dark pigmented areas in brown trout (*Salmo trutta f. fario*)? Developing qualitative versus quantitative approaches, pp. 23-24, 50th Meeting of the Portuguese Microscopy Society.
- DR (2004). Declaração de Rectificação n.º 25/2004 de 23 de Fevereiro de 2004. *Diário da República*, I série - B 45: pp. 945-946.
- DR (2013). Decreto-Lei n.º 113/2013 de 7 de Agosto do Ministério da agricultura, do mar, do ambiente e do ordenamento do território. *Diário da República*, I série, 151: pp. 4709-4739.
- Elliott, J. M. (1976). The energetics of feeding, metabolism and growth of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to body weight, water temperature and ration size. *Journal of Animal Ecology* 45: 923-948.
- Eslamloo, K., Akhavan, S. R., Fallah, F. J., Henry, M. A. (2014). Variations of physiological and innate immunological responses in goldfish (*Carassius auratus*) subjected to recurrent acute stress. *Fish & Shellfish Immunology* 37: 147-153.

FAWC (2009). Five freedoms, <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20121007104210/http://www.fawc.org.uk/freedoms.htm>, acedido em setembro de 2016.

Flodmark, L. E. W., Urke, H. A., Halleraker, J. H., Arnekleiv, J. V., Vøllestad, L. A., Poléo, A. B. S. (2002). Cortisol and glucose responses in juvenile brown trout subjected to a fluctuating flow regime in an artificial stream. *Journal of Fish Biology* 60: 238-248.

Froese, R. (2006). Cube law, condition factor and weight–length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* 22: 241-253.

FSBI (2002). Fish Welfare. Briefing Paper 2, Fisheries Society of the British Isles.

Fujii, R. (2000). The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell & Melanoma Research* 13: 300-319.

Gundersen, H. J. G., Jensen, E. B. (1985). Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *Journal of Microscopy* 138: 127-142.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D., (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontological Association. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm, acedido em agosto de 2016.

Hemsworth, P. H., Mellor, D. J., Cronin, G. M., Tilbrook, A. J. (2015). Scientific assessment of animal welfare. *New Zealand Veterinary Journal* 63: 24-30.

Huntingford, F. A., Kadri, S. (2008). Welfare and fish. Em: *Fish welfare*. 1 (ed), Branson, E. J., Blackwell Publishing Ltd, pp. 19-31.

ICNF (2016). Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal: Peixes dulciaquícolas e migradores. Instituto da Conservação da Natureza, <http://www.icnf.pt/portal/naturaclas/patrinatur/lvv/resource/doc/tab-class-spp/peix>, acedido em setembro de 2016.

Iger, Y., Balm, P. H. M., Jenner, H. A., Bonga, S. E. W. (1995). Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 97: 188-198.

IUCN (2016). The IUCN Red List of threatened species. Version 2016-1, <http://www.iucnredlist.org>, acedido em setembro de 2016.

Iwama, G. K., Ackerman, P. A. (1994). Anaesthetics. Em: *Biochemistry and molecular biology of fish: Analytical techniques*. 1 (ed), Hochachka, P. W., Mommsen, T. P. (eds), Elsevier Science B. V., pp. 1-15.

Iwama, G. K. (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851: 304-310.

Jia, R., Liu, BL., Feng, WR., Han, C., Huang, B., Lei, JL. (2016). Stress and immune responses in skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology* 55: 131-139.

Kaya, Y., Erdem, M. E. (2009). Seasonal comparison of wild and farmed brown trout (*Salmo trutta* forma *fario* L., 1758): Crude lipid, gonadosomatic index and fatty acids. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60: 413-423.

- Kenari, A. A., Mahmoudi, N., Soltani, M., Abediankenari, S. (2013). Dietary nucleotide supplements influence the growth, haemato-immunological parameters and stress responses in endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Aquaculture Nutrition* 19: 54-63.
- Kittilsen, S., Ellis, T., Schjolden, J., Braastad, B. O., Øverli, Ø. (2009a). Determining stress-responsiveness in family groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using non-invasive measures. *Aquaculture* 298: 146-152.
- Kittilsen, S., Schjolden, J., Beitnes-Johansen, I., Shaw, J. C., Pottinger, T. G., Sorensen, C., Braastad, B. O., Bakken, M., Øverli, Ø. (2009b). Melanin-based skin spots reflect stress responsiveness in salmonid fish. *Hormones and Behavior* 56: 292-298.
- Liu, B., Liu, Y., Wang, X. (2015). The effect of stocking density on growth and seven physiological parameters with assessment of their potential as stress response indicators for the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 48: 177-192.
- Logan, C. A., Somero, G. N. (2010). Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864). *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 299: 843-852.
- Lourenço, R. M. V. (2004). Repovoamentos piscícolas em Portugal Continental desde o século XIX, Universidade Técnica de Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, pp. 2-4.
- MacIntyre, C. M., Ellis, T., North, B. P., Turnbull, J. F. (2008). The influences of water quality on the welfare of farmed rainbow trout: A review. Em: *Fish welfare*. 1 (ed), Brason, E. J., Blackwell Publishing Ltd, pp. 150-184.
- Madureira, T. V., Malhão, F., Pinheiro, I., Lopes, C., Ferreira, N., Urbatzka, R., Castro, L. F. C., Rocha, E. (2015). Estrogenic and anti-estrogenic influences in cultured brown trout hepatocytes: Focus on the expression of some estrogen and peroxisomal related genes and linked phenotypic anchors. *Aquatic Toxicology* 169: 133-142.
- Madureira, T. V., Castro, L. F. C., Rocha, E. (2016). Acyl-coenzyme A oxidases 1 and 3 in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*): Can peroxisomal fatty acid β -oxidation be regulated by estrogen signaling? *Fish Physiology and Biochemistry* 42: 389-401.
- Merighe, G. K. F., Pereira-da-Silva, E. M., Negrão, J. A., Ribeiro, S. (2004). Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 33: 828-837.
- Molony, B. (2001). Environmental requirements and tolerances of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) with special reference to Western Australia: A review. *Fisheries research report no. 130*: 3-9.
- Montero, D., Izquierdo, M. S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. M. (1999). High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 53-60.
- Morandini, L., Honji, R. M., Ramallo, M. R., Moreira, R. G., Pandolfi, M. (2014). The interrenal gland in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: Relationship with stress and the establishment of social hierarchies. *General and Comparative Endocrinology* 195: 88-98.

MyAssays, (2012). 500360 Cortisol. Cayman Chemical Company, Inc.. <https://www.myassays.com/cortisol.assay>, acessado em agosto de 2016.

Norris, D. O., Felt, S. B., Woodling, J. D., Dores, R. M. (1997). Immunocytochemical and histological differences in the interrenal axis of feral brown trout, *Salmo trutta*, in metal-contaminated waters. General and Comparative Endocrinology 108: 343-351.

Novais, D. S. (2012). Biologia, ecologia e pesca desportiva da truta, *Salmo trutta* morpha *fario* L., no rio Vez, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar pp. 1-17.

Obernier, J. A., Baldwin, R. L. (2006). Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. Institute for Laboratory Animal Research Journal 47: 364-369.

Oliveira, R. F., Galhardo, L. (2007). Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. Revista Brasileira de Zootecnia 36: 77-86.

Øverli, Ø., Kotzian, S., Winberg, S. (2002). Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout. Hormones and Behavior 42: 53-61.

Pettersen, J. M., Bracke, M. B. M., Midtlyng, P. J., Folkedal, O., Stien, L. H., Steffenak, H., Kristiansen, T. S. (2014). Salmon welfare index model 2.0: An extended model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon, based on a review of selected welfare indicators and intended for fish health professionals. Reviews in Aquaculture 6: 162-179.

Pickering, A. D., Pottinger, T. G., Christie, P. (1982). Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: A time-course study. Journal of Fish Biology 20: 229-244.

Pickering, A. D., Pottinger, T. G. (1985). Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta* L., to disease without reducing the white blood cell count. Journal of Fish Biology 27: 611-619.

Pickering, A. D., Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish Physiology and Biochemistry 7: 253-258.

Porto (2014). Dureza da Água. Águas do Porto, <http://www.aguasdoporto.pt>, acessado em setembro de 2016.

Pottinger, T. G. (2008). The stress response in fish - Mechanisms, effects and measurement. Em: *Fish welfare*. 1 (ed), Branson, E. J., Blackwell Publishing Ltd, pp. 32-48.

Quantpsy.org (2010). Calculation for the Chi-Square Test. Preacher, K. J., <http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>, acessado em agosto de 2016.

Rasband, W. S., (1997). ImageJ. U. S. National Institutes of Health. <http://imagej.nih.gov/ij/>, acessado em agosto de 2016.

Rocha, H. C. (2011). Estudo do comportamento agonístico em juvenis de truta, Universidade Técnica de Lisboa, pp. 16-27.

Ross, L. G., Ross, B. (2008a). Defining stress in aquatic animals. Em: *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3 (ed), Ross, L.G., Ross, B. (eds), Blackwell Publishing Ltd, pp. 7-21.

Ross, L. G., Ross, B. (2008b). Introduction. Em: *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3 (ed), Ross, L. G., Ross, B. (eds), Blackwell Publishing Ltd., pp. 1-5.

Ruane, N. M., Bonga, S. E. W., Balm, P. H. M. (1999). Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary–interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and Comparative Endocrinology* 115: 210-219.

Sampaio, F. D. F., Freire, C. A. (2016). An overview of stress physiology of fish transport: Changes in water quality as a function of transport duration. *Fish and Fisheries* 17: 1055-1072.

Sanchez, W., Piccini, B., Ditché, JM., Porcher, JM. (2008). Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environment International* 34: 791-798.

Santos, M. H. (2014). Bioecologia e conservação das populações de *Salmo trutta* (L.) na bacia hidrográfica do rio Tua (NE Portugal), Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior Agrária, pp. 5-7.

Schubert, S., Peter, A., Burki, R., Schönenberger, R., Suter, M. J., Segner, H., Burkhardt-Holm, P. (2008). Sensitivity of brown trout reproduction to long-term estrogenic exposure. *Aquatic Toxicology* 90: 65-72.

Shabani, F., Erikson, U., Beli, E., Rexhepi, A. (2016). Live transport of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and subsequent live storage in market: Water quality, stress and welfare considerations. *Aquaculture* 453: 110-115.

Shoemaker, C., Xu, DH., LaFrentz, B., LaPatra, S. (2015). Overview of fish immune system and infectious diseases. Em: *Dietary nutrients, additives, and fish health*. 1 (ed), Lee, CS., Lim, C., Gatlin, D. M., Webster, C. D. (eds), John Wiley & Sons, Inc, pp. 1-24.

Silveira, U. S., Logato, P. V. R., Pontes, E. C. (2009). Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. *Revista Eletrônica Nutritime* 6: 817-836.

Sloman, K. A., Gilmour, K. M., Taylor, A. C., Metcalfe, N. B. (2000). Physiological effects of dominance hierarchies within groups of brown trout, *Salmo trutta*, held under simulated natural conditions. *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 11-20.

Socscistatistics (2016). Spearman's Rho Calculator. Stangrrom, J., <http://www.socscistatistics.com/tests/spearman/default2.aspx>, acedido em agosto de 2016.

Tocher, D. R., Glencross, B. D. (2015). Lipids and fatty acids. Em: *Dietary nutrients, additives, and fish health*. 1 (ed), Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Inc, pp. 47-94.

UE (2010). Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos. *Jornal Oficial da União Europeia* L 276: 33-80.

- Urbina, M. A., Schulte, P. M., Bystriansky, J. S., Glover, C. N. (2013). Differential expression of Na⁺, K⁺-ATPase alpha-1 isoforms during seawater acclimation in the amphidromous galaxiid fish *Galaxias maculatus*. *Journal of Comparative Physiology B* 183: 345-357.
- Van der Salm, A. L., Nolan, D. T., Bonga, S. E. W. (2002). In vitro evidence that cortisol directly modulates stress-related responses in the skin epidermis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 9-18.
- Van der Salm, A. L., Martínez, M., Flik, G., Bonga, S. E. W. (2004). Effects of husbandry conditions on the skin colour and stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 241: 371-386.
- VassarStats (2001). Fisher Exact Probability Test. Lowry, R., <http://vassarstats.net/>, acedido em agosto de 2016.
- Wolffrom, T. (2004). Farmed fish and welfare. European Commission: Directorate general for fisheries: Research and scientific analysis unit, pp. 1-39.
- Wu, H., Aoki, A., Arimoto, T., Nakano, T., Ohnuki, H., Murata, M., Ren, H., Endo, H. (2015). Fish stress become visible: A new attempt to use biosensor for real-time monitoring fish stress. *Biosensors and Bioelectronics* 67: 503-510.
- Wysocki, L. E., Montey, K., Popper, A. N. (2009). The influence of ambient temperature and thermal acclimation on hearing in a eurythermal and a stenothermal otophysan fish. *Journal of Experimental Biology* 212: 3091-3099.
- Yarahmadi, P., Miandare, H. K., Hoseinifar, S. H., Gheysvandi, N., Akbarzadeh, A. (2015). The effects of stocking density on hemato-immunological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International* 23: 55-63.
- Zalewski, M., Frankiewicz, P., Brewinska, B. (1985). The factors limiting growth and survival of brown trout, *Salmo trutta* m. *fario* L. introduced to different types of streams. *Journal of Fish Biology* 27: 59-73.

Anexo I – How to Assess Expeditiously the Skin Dark Pigmented Areas in Brown Trout (*Salmo trutta f. fario*)? Developing Qualitative versus Quantitative Approaches

Joana L. Costa¹, Tânia V. Madureira^{1,2}, Fernanda Malhão^{1,2}, Célia Lopes^{1,2}, José F. Gonçalves^{2,3} and Eduardo Rocha^{1,2}

¹ Laboratory of Histology and Embryology, Department of Microscopy, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar (ICBAS), University of Porto, Porto, Portugal.

² Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research (CIIMAR/CIMAR), University of Porto, Porto, Portugal.

³ Laboratory of Aquatic Engineering and Production Systems, Department of Aquatic Production, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar (ICBAS), University of Porto, Porto, Portugal.

The stress reactions in fish have been reported to involve primary, secondary and tertiary responses, this latter corresponding to an unresolved extreme stress situation [1]. There seems to exist a link between fish stress reactions and skin alterations in different species [2]. In rainbow trout, changes in pigmentary cells within the dermis, particularly in the melanophores (black/brown color) resulted in a darkening of the skin, as a consequence of melanosomes migration to the epidermis through cytoplasmic processes. Therefore, fish skin darkening has been referred as a secondary indicator of stress [3]. Currently, the evaluation of fish stress levels are crucial, both in aquaculture large-scale productions and also in laboratory research conditions, to ensure good animal procedures and reproducible data. Skin studies related with stress are mostly based on a morpho-structural analysis [3], and there is clearly a gap regarding the potential use of quantitative methodologies or validated semi-quantitative grading systems.

This study focused on the optimization of an expeditious approach, which relates a qualitative and a quantitative analysis of the existing black/brown pigmentation in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) skin. Within the scope of a large assay, 1-year-old juvenile fish were euthanized with an overdose of anesthesia (with ethylene glycol monophenyl ether) and a full body photograph was immediately taken. Qualitative analysis of pigmentation was performed by defining four degrees: dark (0), dark intermediate (1), pale intermediate (2) and pale (3). Grades were assigned considering the full-length photo of each fish. Two rectangular skin fragments, one on each side of the animal and in a middle point between the midline and the dorsal fin of the fish, were extracted and photographed. Quantitative analysis was done on the images of the skin fragments of each animal using the ImageJ free software (Version 1.4.3.67), transforming a specific area into a black/white binary, and computing the percentage of dark area; corresponding to the pigmented zone (more melanin). The analyses were implemented in 5 fish of each qualitative skin degree.

The percentage of dark skin measured allowed inferring a significant difference between the dark fish and the others classified as intermediates and paler ones. Spearman correlation between the two methods of analysis showed that the percentage of dark pigment tends to decrease as the animals visually lighten their color ($R = -0.61$, $p < 0.004$). This procedure proved to be useful and effective, at least for animals classified as dark, showing that through an animal observation (non-invasive method) we can find the corresponding pigment percentage range. Possibly, by increasing the number of the animals analyzed it could be possible to better define the dark pigment percentage range for the remaining qualitative degrees. The proposed grades are not only easy to use, but they have the advantage to generate numbers amenable to statistics [4].

References:

- [1] TG Pottinger, in: "Fish welfare", ed. EJ Branson, (Blackwell Publishing Ltd, Oxford) (2008), 32-48.
- [2] S Kittilsen *et al*, Hormones and Behavior 56 (2009), 292-298.
- [3] Y Iger *et al*, General and Comparative Endocrinology 97 (1995), 188-198.
- [4] The authors recognize funding from ICBAS, ERDF/COMPETE/FCT (UID/Multi/04423/2013), and post-doc grant (SFRH/BPD/97139/2013). We thank Fernando A. Magalhães and Pedro E. Carvalho for the occasional help with the fish husbandry.

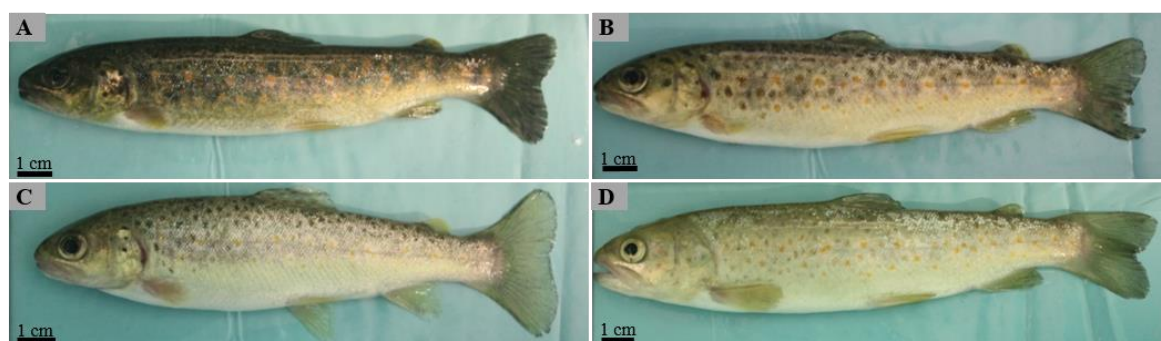


Figure 1. Qualitative classification of the magnitude of the juvenile brown trout skin coloration. **A.** Dark (0); **B.** Dark intermediate (1); **C.** Pale intermediate (2); and **D.** Pale (3).

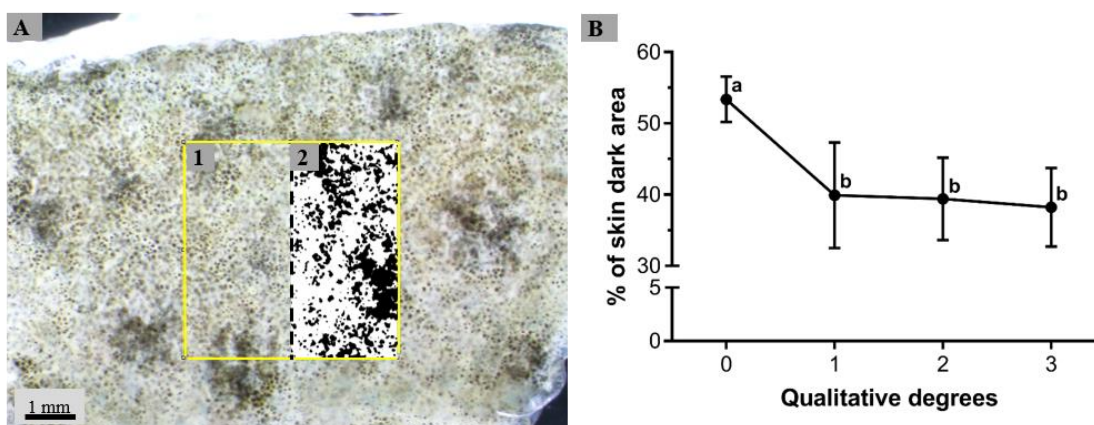


Figure 2. **A.** Representative skin fragment from a juvenile brown trout. The yellow square corresponds to the skin area analyzed with ImageJ software; **1** – Image before processing and **2** – Image after processing to pure binary (black/white). **B.** Percentage (%) of skin dark area in relation to the established qualitative degrees (0 – dark, 1 – dark intermediate, 2 – pale intermediate and 3 – pale). Significant differences are marked with different letters ($p < 0.05$; one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test).

Anexo II – Protocolo de coloração com H&E dos cortes histológicos

1. Desparafinação

- Xilol - 10 minutos
- Xilol - 10 minutos

2. Hidratação

- Etanol absoluto - 5 minutos
- Etanol 95% - 5 minutos
- Etanol 70% - 5 minutos
- Água corrente - 5 minutos

3. Coloração

- Hematoxilina de Mayer - 2 minutos
- Lavar em água corrente - 5 minutos
- Diferenciar rapidamente em álcool - ácido
- Lavar em água corrente - 5 minutos
- Eosina Y aquosa a 1% - 1 minuto
- Passar rapidamente por água corrente

4. Desidratação

- Etanol absoluto I
- Etanol absoluto II
- Etanol absoluto III

5. Diafanização

- Xilol
- Xilol

Anexo III – Protocolo de coloração com tricrómio de Masson dos cortes histológicos

I. Preparação dos reagentes

- Azul Celeste

Solução A - Azul celeste B

Solução B - Sulfato de ferro (III) amoniacal dodecahidratado

Solução C - Glicerina

Solução D - Água destilada

- Solução de trabalho:

- Dissolver 25 g de sulfato de ferro (III) amoniacal dodecahidratado em 500 mL de água destilada (com agitação);
- Adicionar 2,5 g de azul celeste B à solução anterior e ferver a mistura durante alguns minutos;
- Após o arrefecimento, a solução é filtrada;
- Adicionar 70 mL de glicerina.

- Mistura de Ponceau de xilidina/fucsina ácida

Solução A - Ácido acético 1% + Ponceau de xilidina 1%

Solução B - Ácido acético 1% + fucsina ácida 1%

- Solução de trabalho:

- Juntar 2 partes da solução A + 1 parte da solução B.

- Azul de anilina

- Solução de trabalho:

- Azul de anilina 2,5% em ácido acético 2,5%

- Ácido acético 1%

- Ácido fosfomolibdico 1%

II. Procedimentos

1. Desparafinar, hidratar (Anexo I) e lavar as lâminas;
2. Aplicar azul celeste sobre os cortes (5 minutos);
3. Lavar lâminas com água destilada;
4. Aplicar hematoxilina de Mayer sobre os cortes (2 minutos);
5. Lavar lâminas com água corrente (5 minutos);
6. Aplicar mistura de Ponceau de xilidina/fucsina ácida sobre os cortes (5 minutos);
7. Lavar lâminas com água destilada;
8. Aplicar ácido fosfomolibdico a 1% sobre os cortes (5 minutos);
9. Escorrer lâminas;
10. Aplicar azul de anilina sobre os cortes (5 minutos);
11. Diferenciar com ácido acético a 1%;
12. Lavar lâminas com água destilada;
13. Desidratar, diafanizar e montar as lâminas.

Anexo IV – Protocolo para a determinação do cortisol por imuno-histoquímica

I. Preparação de reagentes

- Tampão citrato 0,01 M; pH 6,0

Solução A - Ácido cítrico 0,1 M

Solução B - Citrato de sódio (dí-hidratado) 0,1 M

- Solução de trabalho:

- Juntar 36 mL de solução A + 164 mL de solução B;
- Acertar pH até 6,0 com hidróxido de sódio;
- Perfazer volume até 2000 mL com água destilada.

- Tampão Tris - ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); pH 9,0

Solução A - Tris base 1 mM

Solução B - EDTA 0,05 %

Solução C - Tween 20

- Solução de trabalho:

- Dissolver 1,21 g de solução A e 0,37 g de solução B em 700 mL de água destilada;
- Acertar pH até 9,0 com ácido clorídrico;
- Adicionar 0,5 mL de solução C e agitar;
- Perfazer volume até 1000 mL com água destilada.

- Tampão Tris pH 7,6 (TBS)

Solução A - Tris (121,14 g/L)

Solução B – Ácido clorídrico (83 mL/L)

- Solução mãe:

- Juntar 50 mL solução A Tris + 37,6 mL de solução B;
- Acertar pH até 7,6 com ácido clorídrico;
- Perfazer volume até 100 mL com água destilada.

- Solução de trabalho:
 - Juntar solução mãe + 900 mL de soro fisiológico 0,85%
- 3,3' diaminobenzidina (DAB) (NovoLink™)
 - Solução de trabalho:
 - Diluir cromogénio (RE7162) em tampão de substrato (polímero) (RE7163) (diluição 1:20). Utilizar dentro de 6 horas após preparação.
- 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Santa Cruz Biotechnology)
 - Solução de trabalho:
 - Diluir tampão de substrato em água destilada (diluição 1:10);
 - Diluir substrato na solução anterior (diluição 1:50).

II. Procedimentos

1. Desparafinar e hidratar lâminas;

- Lâminas com recuperação antigénica seguem para o ponto 2.a. ou 2.b.
- Lâminas sem recuperação antigénica seguem para o ponto 3.

2. Recuperação antigénica:

a. Tampão citrato:

- Aquecer o tampão citrato em panela de pressão até ferver;
- Mergulhar as lâminas em tampão citrato;
- Após atingir a pressão máxima na panela contabilizar 2 minutos;
- Deixar arrefecer até à temperatura ambiente.

b. Tampão Tris – EDTA:

- Aquecer o tampão no micro-ondas (700 W) até ferver;
- Colocar as lâminas na solução;
- Deixar ferver as lâminas na solução durante 10 minutos;
- Deixar arrefecer até à temperatura ambiente.

3. Mergulhar as lâminas em água destilada e coloca-las em solução de bloqueio da peroxidase (solução a 3% de peróxido de hidrogénio em metanol) durante 10 minutos;

4. Lavar lâminas em água corrente e mergulha-las em TBS;
5. Incubar com *protein block* (bloqueador proteico) (5 minutos);
6. Escorrer o bloqueador proteico e incubar (2 horas) com:
 - a. Anticorpo primário - nos controlos positivos.
 - b. TBS - nos controlos negativos.
7. Lavar lâminas com TBS (2x; 5 minutos);
8. Incubar com *post primary block* (bloqueador pós-primário) (30 minutos);
9. Lavar lâminas com TBS (2x; 5 minutos);
10. Incubar com polymer (polímero) (30 minutos);
11. Lavar lâminas com TBS, agitando levemente (2x; 5 minutos);
12. Adicionar cromogénio:
 - a. DAB (5 minutos).
 - b. AEC (30 minutos).
13. Lavar lâminas em água destilada (4x);
14. Contrastar com hematoxilina (2 minutos);
15. Lavar as lâminas em água corrente (5 minutos);
16. Montar as lâminas:
 - a. Cromogénio utilizado: DAB
 - Lâminas desidratadas e diafanizadas em xilol;
 - Montar lâminas com DPX (Sigma®).
 - b. Cromogénio utilizado: AEC
 - Montar lâminas com meio aquoso (Aquatex®).

Anexo V - Protocolo para a quantificação dos níveis plasmáticos de cortisol por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

I. Preparação de Reagentes/Amostras

Todos os reagentes e amostras têm de ser mantidos à temperatura ambiente durante pelo menos 30 minutos antes da utilização.

- Tampão de lavagem
 - Diluir 5 mL do tampão de lavagem concentrado em 95 mL de água destilada.
- Amostras
 - Agitar plasma no vórtex e centrifugar (1 min/8000 g);
 - Diluir 1 parte de reagente de deslocamento de esteroides para cada 99 partes de plasma.
- Padrões de cortisol

Padrões	Tampão de ensaio (µL)	Volume adicionado (µL)	Concentração de cortisol (pg/mL)
1	900	100, cortisol padrão	10 000
2	500	500, padrão 1	5000
3	500	500, padrão 2	2500
4	500	500, padrão 3	1250
5	500	500, padrão 4	625
6	500	500, padrão 5	313
7	500	500, padrão 6	156

- Agitar no vórtex e centrifugar (1 min/8000 g) cada padrão no final da sua preparação.

II. Procedimentos

1. Pipetar 150 µL de tampão de ensaio nos poços Ligação Não Específica (LNE) e 100 µL nos poços Ligação Máxima (LM);

2. Centrifugar e pipetar 100 μL dos padrões de cortisol (PC) 1-7, preparados anteriormente, para os poços adequados;
3. Centrifugar e pipetar 100 μL da amostra nos poços apropriados;
4. Pipetar 50 μL de conjugado de cortisol em cada poço, exceto nos poços Atividade Total (AT) e Branco (B);
5. Pipetar 50 μL de anticorpo cortisol em cada poço, exceto nos poços, AT, LNE e B;

NOTA: Deve verificar-se cor verde nos poços exceto nos poços LNE que deve ser azul. Os poços B e AT estão vazios neste momento e não têm cor.

6. Incubar a placa à temperatura ambiente durante 2 horas, com agitação constante de 500 rpm;
7. Esvaziar o conteúdo de todos os poços e lavar, adicionando-se 400 μL de tampão de lavagem a cada poço; repetir a lavagem mais 2 vezes;
8. Após a lavagem final, bater firmemente com a placa num papel, para remover qualquer remanesência de tampão de lavagem;
9. Adicionar 5 μL do conjugado de cortisol aos poços AT;
10. Adicionar 200 μL de substrato pNpp a cada poço; incubar à temperatura ambiente durante 1 hora sem agitação;
11. Adicionar 50 μL de solução de paragem a cada poço; a solução interrompe a reação e a placa deve ser lida imediatamente.

Todas as centrifugações referidas são a 8000 g , durante 1 minuto.

III. Exemplo de um esquema experimental

As tabelas I a VI representam uma situação exemplificativa em que os poços representam: A2 a F3 - curva de calibração, A1 e B1 - Branco (B), C1 e D1 - Atividade Total (AT), E1 e F1 - Ligação Não Específica (LNE), G1 e H1 - Ligação Máxima (LM) e G3 a H4 representam as 5 amostras analisadas. Na coluna da direita são indicados por ordem os passos realizados na execução do protocolo.

Tabela I. Quantificação das concentrações plasmáticas de cortisol por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)- Etapa I.

A1 B	A2 PC 1 • 100 µL Padrão de cortisol 1	A3 PC 5 • 100 µL Padrão de cortisol 5	A4 Amostra 2 • 100 µL Amostra 2	I 1º Tampão de ensaio 2º Centrifugar e pipetar Padrões de cortisol 3º Centrifugar e pipetar Amostras
B1 B	B2 PC 1 • 100 µL Padrão de cortisol 1	B3 PC 5 • 100 µL Padrão de cortisol 5	B4 Amostra 2 • 100 µL Amostra 2	
C1 AT	C2 PC 2 • 100 µL Padrão de cortisol 2	C3 PC 6 • 100 µL Padrão de cortisol 6	C4 Amostra 3 • 100 µL Amostra 3	
D1 AT	D2 PC 2 • 100 µL Padrão de cortisol 2	D3 PC 6 • 100 µL Padrão de cortisol 6	D4 Amostra 3 • 100 µL Amostra 3	
E1 LNE • 150 µL Tampão de ensaio	E2 PC 3 • 100 µL Padrão de cortisol 3	E3 PC 7 • 100 µL Padrão de cortisol 7	E4 Amostra 4 • 100 µL Amostra 4	
F1 LNE • 150 µL Tampão de ensaio	F2 PC 3 • 100 µL Padrão de cortisol 3	F3 PC 7 • 100 µL Padrão de cortisol 7	F4 Amostra 4 • 100 µL Amostra 4	
G1 LM • 150 µL Tampão de ensaio	G2 PC 4 • 100 µL Padrão de cortisol 4	G3 Amostra 1 • 100 µL Amostra 1	G4 Amostra 5 • 100 µL Amostra 5	
H1 LM • 150 µL Tampão de ensaio	H2 PC 4 • 100 µL Padrão de cortisol 4	H3 Amostra 1 • 100 µL Amostra 1	H4 Amostra 5 • 100 µL Amostra 5	

Tabela II. Quantificação das concentrações plasmáticas de cortisol por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)- Etapa II.

A1 B	A2 PC 1 • 50 µL Conjugado de cortisol	A3 PC 5 • 50 µL Conjugado de cortisol	A4 Amostra 2 • 50 µL Conjugado de cortisol	II 1º Conjugado de cortisol
B1 B	B2 PC 1 • 50 µL Conjugado de cortisol	B3 PC 5 • 50 µL Conjugado de cortisol	B4 Amostra 2 • 50 µL Conjugado de cortisol	
C1 AT	C2 PC 2 • 50 µL Conjugado de cortisol	C3 PC 6 • 50 µL Conjugado de cortisol	C4 Amostra 3 • 50 µL Conjugado de cortisol	
D1 AT	D2 PC 2 • 50 µL Conjugado de cortisol	D3 PC 6 • 50 µL Conjugado de cortisol	D4 Amostra 3 • 50 µL Conjugado de cortisol	
E1 LNE • 50 µL Conjugado de cortisol	E2 PC 3 • 50 µL Conjugado de cortisol	E3 PC 7 • 50 µL Conjugado de cortisol	E4 Amostra 4 • 50 µL Conjugado de cortisol	
F1 LNE • 50 µL Conjugado de cortisol	F2 PC 3 • 50 µL Conjugado de cortisol	F3 PC 7 • 50 µL Conjugado de cortisol	F4 Amostra 4 • 50 µL Conjugado de cortisol	
G1 LM • 50 µL Conjugado de cortisol	G2 PC 4 • 50 µL Conjugado de cortisol	G3 Amostra 1 • 50 µL Conjugado de cortisol	G4 Amostra 5 • 50 µL Conjugado de cortisol	
H1 LM • 50 µL Conjugado de cortisol	H2 PC 4 • 50 µL Conjugado de cortisol	H3 Amostra 1 • 50 µL Conjugado de cortisol	H4 Amostra 5 • 50 µL Conjugado de cortisol	

Tabela III. Quantificação das concentrações plasmáticas de cortisol por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)- Etapa III.

A1 B	A2 PC 1 • 50 µL Anticorpo cortisol	A3 PC 5 • 50 µL Anticorpo cortisol	A4 Amostra 2 • 50 µL Anticorpo cortisol	<div>III</div> <p>1º Anticorpo cortisol</p> <p>2º LNE cor azul / poços B e AT vazios e não têm cor / restantes poços cor verde.</p> <p>3º Incubar a placa à temperatura ambiente num agitador de placas durante 2 horas a 500 rpm.</p>
B1 B	B2 PC 1 • 50 µL Anticorpo cortisol	B3 PC 5 • 50 µL Anticorpo cortisol	B4 Amostra 2 • 50 µL Anticorpo cortisol	
C1 AT	C2 PC 2 • 50 µL Anticorpo cortisol	C3 PC 6 • 50 µL Anticorpo cortisol	C4 Amostra 3 • 50 µL Anticorpo cortisol	
D1 AT	D2 PC 2 • 50 µL Anticorpo cortisol	D3 PC 6 • 50 µL Anticorpo cortisol	D4 Amostra 3 • 50 µL Anticorpo cortisol	
E1 LNE	E2 PC 3 • 50 µL Anticorpo cortisol	E3 PC 7 • 50 µL Anticorpo cortisol	E4 Amostra 4 • 50 µL Anticorpo cortisol	
F1 LNE	F2 PC 3 • 50 µL Anticorpo cortisol	F3 PC 7 • 50 µL Anticorpo cortisol	F4 Amostra 4 • 50 µL Anticorpo cortisol	
G1 LM • 50 µL Anticorpo cortisol	G2 PC 4 • 50 µL Anticorpo cortisol	G3 Amostra 1 • 50 µL Anticorpo cortisol	G4 Amostra 5 • 50 µL Anticorpo cortisol	
H1 LM • 50 µL Anticorpo cortisol	H2 PC 4 • 50 µL Anticorpo cortisol	H3 Amostra 1 • 50 µL Anticorpo cortisol	H4 Amostra 5 • 50 µL Anticorpo cortisol	

Tabela IV. Quantificação das concentrações plasmáticas de cortisol por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)- Etapa IV.

A1 B • 400 µL Tampão de lavagem 3x	A2 PC 1 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	A3 PC 5 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	A4 Amostra 2 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	<div>IV</div> <p>1º Esvaziar o conteúdo de todos os poços</p> <p>2º Lavar todos os poços com 400 µL Tampão de lavagem repetir 3x</p>
B1 B • 400 µL Tampão de lavagem 3x	B2 PC 1 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	B3 PC 5 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	B4 Amostra 2 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	
C1 AT • 400 µL Tampão de lavagem 3x	C2 PC 2 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	C3 PC 6 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	C4 Amostra 3 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	
D1 AT • 400 µL Tampão de lavagem 3x	D2 PC 2 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	D3 PC 6 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	D4 Amostra 3 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	
E1 LNE • 400 µL Tampão de lavagem 3x	E2 PC 3 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	E3 PC 7 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	E4 Amostra 4 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	
F1 LNE • 400 µL Tampão de lavagem 3x	F2 PC 3 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	F3 PC 7 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	F4 Amostra 4 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	
G1 LM • 400 µL Tampão de lavagem 3x	G2 PC 4 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	G3 Amostra 1 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	G4 Amostra 5 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	
H1 LM • 400 µL Tampão de lavagem 3x	H2 PC 4 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	H3 Amostra 1 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	H4 Amostra 5 • 400 µL Tampão de lavagem 3x	

Tabela V. Quantificação das concentrações plasmáticas de cortisol por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)- Etapa V.

A1 B • 200 µL Substrato pNpp	A2 PC 1 • 200 µL Substrato pNpp	A3 PC 5 • 200 µL Substrato pNpp	A4 Amostra 2 • 200 µL Substrato pNpp	V 1° Conjugado de cortisol 2° Substrato pNpp 3° Incubar à temperatura ambiente durante 1 hora sem agitação.
B1 B • 200 µL Substrato pNpp	B2 PC 1 • 200 µL Substrato pNpp	B3 PC 5 • 200 µL Substrato pNpp	B4 Amostra 2 • 200 µL Substrato pNpp	
C1 AT • 5 µL Conjugado de cortisol • 200 µL Substrato pNpp	C2 PC 2 • 200 µL Substrato pNpp	C3 PC 6 • 200 µL Substrato pNpp	C4 Amostra 3 • 200 µL Substrato pNpp	
D1 AT • 5 µL Conjugado de cortisol • 200 µL Substrato pNpp	D2 PC 2 • 200 µL Substrato pNpp	D3 PC 6 • 200 µL Substrato pNpp	D4 Amostra 3 • 200 µL Substrato pNpp	
E1 LNE • 200 µL Substrato pNpp	E2 PC 3 • 200 µL Substrato pNpp	E3 PC 7 • 200 µL Substrato pNpp	E4 Amostra 4 • 200 µL Substrato pNpp	
F1 LNE • 200 µL Substrato pNpp	F2 PC 3 • 200 µL Substrato pNpp	F3 PC 7 • 200 µL Substrato pNpp	F4 Amostra 4 • 200 µL Substrato pNpp	
G1 LM • 200 µL Substrato pNpp	G2 PC 4 • 200 µL Substrato pNpp	G3 Amostra 1 • 200 µL Substrato pNpp	G4 Amostra 5 • 200 µL Substrato pNpp	
H1 LM • 200 µL Substrato pNpp	H2 PC 4 • 200 µL Substrato pNpp	H3 Amostra 1 • 200 µL Substrato pNpp	H4 Amostra 5 • 200 µL Substrato pNpp	

Tabela VI. Quantificação das concentrações plasmáticas de cortisol por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)- Etapa VI.

A1 B • 50 µL Solução de paragem	A2 PC 1 • 50 µL Solução de paragem	A3 PC 5 • 50 µL Solução de paragem	A4 Amostra 2 • 50 µL Solução de paragem	VI 1° Solução de paragem 2° A placa deve ser lida imediatamente Ler a densidade ótica a 405 nm, de preferência com correção entre 570 e 590 nm.
B1 B • 50 µL Solução de paragem	B2 PC 1 • 50 µL Solução de paragem	B3 PC 5 • 50 µL Solução de paragem	B4 Amostra 2 • 50 µL Solução de paragem	
C1 AT • 50 µL Solução de paragem	C2 PC 2 • 50 µL Solução de paragem	C3 PC 6 • 50 µL Solução de paragem	C4 Amostra 3 • 50 µL Solução de paragem	
D1 AT • 50 µL Solução de paragem	D2 PC 2 • 50 µL Solução de paragem	D3 PC 6 • 50 µL Solução de paragem	D4 Amostra 3 • 50 µL Solução de paragem	
E1 LNE • 50 µL Solução de paragem	E2 PC 3 • 50 µL Solução de paragem	E3 PC 7 • 50 µL Solução de paragem	E4 Amostra 4 • 50 µL Solução de paragem	
F1 LNE • 50 µL Solução de paragem	F2 PC 3 • 50 µL Solução de paragem	F3 PC 7 • 50 µL Solução de paragem	F4 Amostra 4 • 50 µL Solução de paragem	
G1 LM • 50 µL Solução de paragem	G2 PC 4 • 50 µL Solução de paragem	G3 Amostra 1 • 50 µL Solução de paragem	G4 Amostra 5 • 50 µL Solução de paragem	
H1 LM • 50 µL Solução de paragem	H2 PC 4 • 50 µL Solução de paragem	H3 Amostra 1 • 50 µL Solução de paragem	H4 Amostra 5 • 50 µL Solução de paragem	

Anexo VI – Dados da análise estatística

Tabela I. Mínimos (Mín.), medianas (Med.) e máximos (Máx.) calculados para cada um dos parâmetros biométricos e para o hematócrito nos vários tempos das colheitas (12 horas, 7, 14, 28 e 42 dias).

Tempo pós-stress Parâmetro	12H			7D			14D			28D			42D		
	Mín.	Med.	Máx.	Mín.	Med.	Máx.	Mín.	Med.	Máx.	Mín.	Med.	Máx.	Mín.	Med.	Máx.
Comprimento <i>standard</i> (cm)	12,00	15,00	16,30	12,30	14,70	17,00	13,30	15,00	16,50	14,00	14,80	18,00	13,20	15,00	16,80
Comprimento total (cm)	12,80	16,15	17,50	14,00	16,00	18,50	14,50	16,50	18,00	15,50	16,00	19,50	15,00	16,80	18,50
Peso do animal (g)	21,37	44,15	58,49	28,52	38,60	57,50	32,81	40,86	64,56	32,11	45,67	90,67	27,80	45,46	67,74
Fator de condição	0,89	1,03	1,22	0,75	1,03	1,15	0,83	1,03	1,34	0,78	1,02	1,25	0,75	1,06	1,35
Peso fígado (g)	0,2494	0,6236	1,0267	0,2891	0,4379	0,8528	0,3390	0,4922	1,1800	0,2453	0,7113	2,1652	0,2570	0,6236	1,8735
Índice hepatossomático	1,00	1,34	2,31	0,90	1,12	2,03	0,78	1,26	1,94	0,69	1,57	2,56	0,73	1,30	2,39
Peso total rim (g)	0,1817	0,3941	0,5303	0,2686	0,3480	0,5473	0,2816	0,3870	0,6795	0,2548	0,4455	0,8678	0,2266	0,4690	0,6914
Índice nefrossomático	0,80	0,87	1,13	0,66	0,99	1,18	0,75	0,90	1,15	0,71	0,90	1,10	0,75	0,93	1,27
Peso rim anterior (g)	0,0580	0,1173	0,1642	0,0884	0,1218	0,1962	0,0856	0,1260	0,2792	0,0706	0,1352	0,2662	0,0642	0,1426	0,2704
Hematócrito (%)	30	32	35	28	32	38	30	32	40	27	35	42	29	33	37

Tabela II. Correlações de Spearman analisadas, com os respectivos valores de R e de p.

Parâmetros correlacionados		R	p
Peso do animal	Concentração plasmática de cortisol	0,09	0,629
Fator de condição	Concentração plasmática de cortisol	0,15	0,411
Peso do animal	Glucose	0,17	0,184
Fator de condição	Glucose	0,31	0,012
\bar{v}_v do núcleo das células interrenais	Concentração plasmática de cortisol	0,53	0,019
% área pigmentada dos fragmentos de pele	Concentração plasmática de cortisol	0,58	0,000
% área pigmentada dos cortes histológicos de pele	Concentração plasmática de cortisol	0,34	0,056
% área pigmentada dos fragmentos de pele	% área pigmentada dos cortes histológicos de pele	0,70	0,000
Índice hepatossomático	Colesterol	0,63	0,000
Índice hepatossomático	Triglicerídeos	0,39	0,001
Glucose	Concentração plasmática de cortisol	0,62	0,000

Tabela III. Regressões lineares analisadas para os parâmetros selecionados, com os respectivos valores de R e p.

Regressão linear (parâmetros)		R	p
Dia da colheita	\bar{v}_v do núcleo das células interrenais	0,514	0,004
Dia da colheita	Concentração plasmática de cortisol	0,424	0,016
Dia da colheita	Índice hepatossomático	0,133	0,284
Dia da colheita	Índice nefrossomático	0,036	0,773
Dia da colheita	Fator de condição	0,027	0,829
Dia da colheita	Potássio	0,336	0,005
Dia da colheita	Triglicerídeos	0,067	0,588

Avaliação multiparamétrica da aclimação de juvenis de truta-fário (*Salmo trutta* f. *fario*) para estudos experimentais

Joana Luísa Costa

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

